

Untersuchungen zur Degradation
von β -Lipotropin
im Fettgewebe des Kaninchens

Gerald Bernd Jacob



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Medizinischen Klinik, Klinikum Großhadern,
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. G. Paumgartner

Untersuchungen zur Degradation von β -Lipotropin
im Fettgewebe des Kaninchens

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gerald Bernd Jacob
aus
Porto / Portugal

München 1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Schwandt
Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Paumgartner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. W.O. Richter

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.1987

Meiner Frau gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methodik	9
1. B-Lipotropin-Herstellung	9
2. Fettgewebsgewinnung	12
2.1. Präparation isolierter Fettzellen	12
2.2. Fettgewebsstücke	16
2.3. Fettgewebshomogenat	17
3. Inkubationsversuche	18
4. Inkubationsende	20
4.1. Zentrifugieren mit Filtrationsmembranen	20
4.2. Absaugen über Filterpapier mit Vielfachfiltrations- gerät	20
4.3. Zentrifugieren und Absaugen des Unterstandes	21
4.4. Zusatz von Orthophosphorsäure	21
4.5. Zusatz von Dinonylphthalat	22
5. Analytische Methoden	22
5.1. Acrylamidgelelektrophorese	22
5.1.a. Materialien	22
5.1.b.1. Entsalzen mit Ultrafiltrationsmembran	24
5.1.b.2. Gelherstellung	25
5.1.b.3. Durchführung der Elektrophorese	25
5.1.b.4. Fixieren und Färben	26
5.1.b.5. Scannen der Gele	26
5.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	27
5.2.a. Materialien	27
5.2.b.1. Analyse von Peptidmischungen	28

	Seite
5.2.b.2. Präparative Auftrennung der β -LPH-Spaltstücke	35
6. Molekulargewichtsbestimmung mit Gelpermeations- chromatographie	37
7. Analysenauswertung	45
C. Ergebnisse	47
1. Analysemethoden der Degradation von β -LPH	47
1.1. Polyacrylamidgelelektrophorese	47
1.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	49
2. Einfluß von verschiedenen Collagenasen	54
3. Einfluß der Trennverfahren nach Inkubationsende auf die Degradation	61
3.1. Zentrifugation durch Filtrationsmembranen	61
3.2. Absaugen über Filterpapier mit Vielfachfiltrations- gerät	62
3.3. Zentrifugation und Absaugen des Unterstandes	62
3.4. Zusatz von Orthophosphorsäure	63
3.5. Zusatz von Trennöl	64
4. Zeitabhängigkeit der Degradation von β -LPH	65
5. Abbau von β -LPH mit verschiedenen Mengen Fettgewebe	67
6. Abbau von β -LPH bei verschiedenem pH	69
7. Abbau von β -LPH durch Fettgewebe von Kaninchen unter verschiedenen Ernährungszuständen	70
8. Abbau von β -LPH durch Fettgewebe von gleichaltrigen Kaninchen mit unterschiedlichem Körpergewicht	72
9. Hemmung des Abbaus von β -LPH im Fettgewebe durch Insulin	73
10. Beeinflussung des Abbaus von β -LPH durch Proteasen- inhibitoren	74

	Seite
11. Molekulargewichtsbestimmung und weitere Analyse der Spaltstücke nach Inkubation von β -LPH mit Fettgewebe	85
D. Diskussion	86
1. Trennung von Peptidmischungen	86
2. Die Degradation von β -LPH im Fettgewebe des Kaninchens	91
3. Einfluß von Collagenasepräparationen auf den β -LPH- -Abbau	92
4. Verschiedene Einflüsse auf den Abbau von β -LPH im Fettgewebe	95
5. Die Hemmung der Degradation von β -LPH durch Enzym- inhibitoren	97
6. Hinweise für eine Regulation der Fettgewebsmobili- sation durch β -LPH	103
E. Zusammenfassung	111
F. Literaturverzeichnis	114

A. EINLEITUNG

1925 wurde erstmals von Coope und Chamberlain ein Einfluß der Hypophyse auf den Lipidstoffwechsel vermutet, da sie bei Ratten nach Gabe von Hypophysenextrakten eine Fettzunahme in der Leber beobachteten.

Anselmino und Hoffmann (1931) fanden nach intravenöser Injektion von Hypophysenvorderlappenextrakten bei Versuchstieren und beim Menschen einen Anstieg der Ketonkörper und schlossen deshalb auf das Vorhandensein eines "Fettstoffwechselhormones" in der Hypophyse.

Als später rein dargestellte Hormone untersucht werden konnten, fanden White und Engel (1958), daß das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) in vitro die Freisetzung von freien Fettsäuren aus dem Fettgewebe von Ratten stimulierte. Ebenso wirkten in weit schwächerer Form das Somatotrope Hormon (GH) (Lee et al. 1975) und auch Präparationen des Thyreotropen Hormons (TSH) (Freinkel 1961, Rudman et al. 1963). Inzwischen konnte zumindest für das TSH gezeigt werden, daß diese Wirkung auf Kontaminationen in den Präparationen zurückzuführen war (Stevenson und Fernie 1973, Weisweiler und Schwandt 1974). Für GH ist die Diskussion noch nicht abgeschlossen: Neuere Untersuchungen (Frigeri et al. 1983, Barenton et al. 1984, Bowden et al. 1985) zeigten die Unwirksamkeit dieses Hormons an Kaninchen- und Rattenfettgewebe, nur Goodman (1983) führt nach wie vor die lipolytische

Wirkung von Wachstumshormon nicht auf Kontaminationen, sondern auf das eigentliche Molekül zurück. 1962 zeigte Tanaka, daß die N-terminale Sequenz 1 - 17 von ACTH für die lipolytische Aktivität an Ratten- und Kaninchenfettgewebe in vitro verantwortlich ist.

1965 konnte ein Peptidhormon aus dem Hypophysenvorderlappen mit einer ausgeprägten lipolytischen Aktivität identifiziert werden, das β -Lipotropin genannt wurde (Li et al.). Mit β -LPH aus Schweinehypophysen konnte eine Stimulation der Lipolyse bis herab zu einer Konzentration von 10^{-13} mol/l an isolierten, perifundierten Fettzellen vom Kaninchen erreicht werden (Schwandt et al. 1981). Diese Konzentration liegt in einem so niedrigen Bereich (Serumwerte beim Menschen 2 - 8 fmol/l; Petraglia et al. 1983), daß angenommen werden kann, daß β -LPH auch in vivo in der Regulation des Fettgewebes eine Rolle spielen könnte.

β -Lipotropin (β -LPH) ist ein Peptidhormon mit 91 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 9200, das Li et al. zuerst aus Schafshypophysenvorderlappen isolierten und dessen Aminosäuresequenz 1965 bestimmt wurde. Die Aminosäuresequenz des β -LPH vom Rind (Lohmar und Li 1967) ist identisch. 1970 veröffentlichten Gilardeau und Chretien die Sequenz des β -LPH aus Schweinehypophysenvorderlappen, dessen C-terminaler Teil mit dem aus Schafshypophysen isolierten β -LPH übereinstimmt, während sich in den N-terminalen 43 Aminosäuren geringe

Unterschiede zeigen (Abbildung 1) (Gilardeau und Chretien 1972). Die Aminosäuresequenz des menschlichen β -LPH wurde 1981 von Li et al. aufgeklärt.

β -Lipotropin beinhaltet die Aminosäuresequenzen von β -Endorphin (β -LPH 61 - 91), α -Endorphin (β -LPH 61 - 76), γ -LPH (β -LPH 1 - 58), β -MSH (β -LPH 41 - 58) und Met-Enkephalin (β -LPH 61 - 65). β -Endorphin ist ein analgetisch potentes endogenes Opioid (Loh et al. 1976), MSH ist hauptsächlich für seine melanocyten-stimulierende Funktion bekannt, die allerdings beim Menschen eine untergeordnete Rolle spielen soll (Fitzpatrick und Mosher 1983).

Für ACTH und β -LPH wurde ein gemeinsames Vorläuferpeptid, das Proopiomelanocorticotropin, mit einem Molekulargewicht von 31 000 gefunden (Mains et al. 1977, Roberts und Herbert 1977, Nakanishi et al. 1979, Hakanson et al. 1980). Es besteht aus einem tryptophanreichen Teil, ACTH 1 - 39 und β -LPH 1 - 91. Im Tryptophan-reichen Peptid konnte die Aminosäuresequenz von γ -MSH identifiziert werden, in der ACTH-Sequenz α -MSH (ACTH 1 - 13) und CLIP (ACTH 18 - 39) (Abbildung 2).

β -LPH, β -MSH und ACTH besitzen eine identische Aminosäureteilsequenz, das sogenannte Heptapeptid (β -LPH 47 - 53 = ACTH 4 - 10 = β -MSH 7 - 13).

Proopiomelanocorticotropin und Teilsequenzen

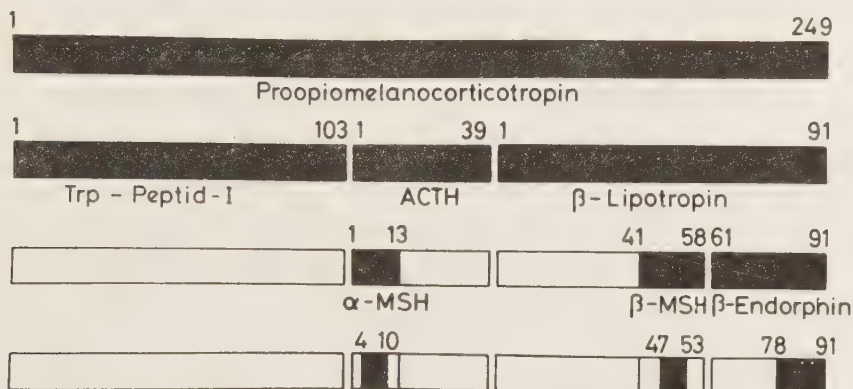


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Proopiomelanocorticotropin (nach Nakanishi et al. 1979, modifiziert für β -Lipotropin aus Schweinehypophysen). Trp-Peptid-I = Tryptophan-reiches Peptid nach Hakanson et al. 1980.

β -LPH ist in der Lage in vitro die Lipolyse im Fettgewebe der Ratte (Lohmar und Li 1968, Gilardeau und Chretien 1970), des Schweines (Cseh und Graf 1968), des Kaninchens (Cseh und Graf 1968, Gilardeau und Chretien 1970, Richter et al. 1979) und des Menschen (Cseh, Graf und Goth 1968, Richter und Schwandt 1981) zu stimulieren. In vivo wurde ein Anstieg von Glycerin, β -Hydroxybuttersäure und Acetoacetat im Plasma des Kaninchens nach intravenöser Gabe von β -LPH nachgewiesen (Tamasi et al. 1969, Chretien et al. 1970,

Lis et al. 1972, Richter et al. 1984). Auch für Teilsequenzen des B-Lipotropin wie B-Endorphin (B-LPH 61 - 91) und B-MSH (B-LPH 41 - 58) konnte eine lipolytische Aktivität an Kaninchenfettgewebe gefunden werden (Dra-
per et al. 1973, Li und Chung 1976, Graf et al. 1977, Jean-Baptiste und Rizack 1980, Richter und Schwandt 1983). Dabei konnten als kleinste lipolytisch aktive Sequenzen das Heptapeptid Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly (B-LPH 47 - 53) und der C-terminale Teil des B-Endorphins (kleiner als B-LPH 78 - 91, aber größer als B-LPH 87 - 91) charakterisiert werden (Richter et al. 1981).

Die Teilsequenzen des Proopiomelanocorticotropin und somit auch das B-LPH werden hauptsächlich im Vorderlappen der Hypophyse gefunden, bei Säugetieren auch in der beim Menschen nur noch rudimentär vorhandenen Pars intermedia (Bloom et al. 1977). Als Entstehungsort werden die sekretorischen Granula der adrenicotrophen Zellen (α_2 -Zellen, azidophile rote Granula) angenommen. Messungen im Plasma des Menschen ergaben, daß ACTH, B-Endorphin und B-LPH in einer gemeinsamen zirkadianen Rhythmik auftreten, wobei eine Steuerung über den Corticotropin-releasing-Faktor als wahrscheinlich gilt (Pe-
traglia et al. 1983). Bekannt ist, daß i.v. injiziertes B-LPH eine kurze biologische Halbwertszeit im Plasma des Menschen hat (Aronin et al. 1981).

Für eine Reihe von Peptiden konnte der Abbau in den Zellen nachgewiesen werden, auf die sie ihre Wirkung

entfalten (Gorden et al. 1980). So findet eine rezeptorvermittelte Degradation von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) durch Fibroblasten statt, die durch lysosomale Proteaseninhibitoren gehemmt werden kann (Carpenter und Cohen 1976). Ebenso wird hGH an einen spezifischen Rezeptor an humane, kultivierte Lymphocyten gebunden, internalisiert und lysosomal abgebaut (Hizuka et al. 1981). Für Insulin gibt es sowohl einen rezeptorvermittelten Abbauweg, wobei es als Komplex mit dem Rezeptor durch Endocytose in die Zelle (z.B. Hepatocyten) eingeschleust wird und lysosomal in kleine Peptide oder Aminosäuren degradiert wird (Terris und Steiner 1975, Gorden et al. 1980), als auch einen nicht lysosomalen Abbau wie an Homogenaten von Leber, Muskel, Niere (Kitabchi und Stentz 1972, Duckworth et al. 1972) und an Adipocyten der Ratte gezeigt werden konnte (Gorden et al. 1982, Sonne und Gliemann 1983).

Da darüberhinaus B-LPH aber nicht nur als gesamtes Molekül lipolytisch aktiv ist, sondern auch Teilsequenzen die Lipolyse stimulieren, sollen mit der vorliegenden Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Wird B-Lipotropin im Fettgewebe abgebaut?
- 2) Lassen sich zutreffendenfalls die Abbaumechanismen weiter charakterisieren?

3) Bestehen Zusammenhänge zwischen Abbau und lipolytischer Aktivität von β -Lipotropin?

Peak V B-MSH und Peak VI B-Endorphin und ACTH (Graf und Cseh 1968, Gilardeau und Chretien 1970) (Flußrate 45 ml/h, Fraktion 4,5 ml, Raumtemperatur), s. Abbildung 4.

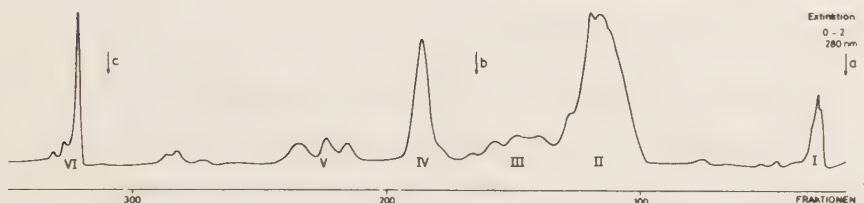


Abbildung 4: Chromatogramm der Auftrennung von Rohfraktion D mit CM-Cellulose. Peakbezeichnungen s. Text.

Das Lyophilisat von Peak IV wurde weiter mit Hochdruck-flüssigkeitschromatographie (HPLC) (Schwandt und Richter 1980) gereinigt. Verwendet wurde eine Kieselgel-Reversed-phase C 18 Säule. Die Partikelgröße des Kieselgels betrug 10 µm, die Säule hatte einen inneren Durchmesser von 0,46 cm und eine Länge von 30 cm. Zusätzlich wurde eine Vorsäule mit dem gleichen Material eingesetzt (0,46 i.D. x 4 cm). Zur präparativen Trennung des B-LPH wurde ein isokratisches Verfahren mit 41 % Puffer A angewandt (Elutionsmittel Puffer A = Methanol, Puffer B = 0,1 mol/l Natriumphosphat pH 2,1, Flußrate 1 ml/min, Detektion bei 225 nm). Weitere Angaben zu HPLC unter 5.2.

Durch stufenweise Zugabe von Aceton bis zu einer Konzentration von 95 % trat ein Präzipitat auf, das nach Absaugen des Extraktionsmittels unter Stickstoff getrocknet wurde. Das Acetonpräzipitat wurde in Wasser bei 4°C gelöst und die prolaktinreiche Fraktion durch Zusatz einer gesättigten 6 % NaCl-Lösung gefällt. Zum verbleibenden Überstand wurde nach Einstellen des pH-Wertes auf 3,0 erneut NaCl bis zu einer Konzentration von 360 g/l hinzugefügt, dabei fielen die Neurophysine und B-LPH durch Zentrifugation aus (20 000 g, 15 min, 4°C).

Nach Auflösung des Präzipitats in eiskaltem Wasser mit einigen Tropfen konzentrierter Essigsäure wurde eine Dialyse gegen bidestilliertes Wasser durchgeführt (4°C, 3x5 l, 48 h, Dialyseschläuche Visking 18/32, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD), das nach Zentrifugation gewonnene Präzipitat durch Zugabe einiger Tropfen CH_3COOH erneut gelöst und lyophilisiert.

Das lyophilisierte Material, nach Li et al. (1965) Fraktion D genannt, wurde durch Ionenaustauschchromatographie auf einer CM-Cellulose-Säule (2x60 cm), die mit 0,01 mol/l Ammoniumacetatpuffer pH 4,6 äquilibriert war, zunächst mit 0,1 mol/l Ammoniumacetat pH 6,7 eluiert, anschließend weiter mit 0,2 mol/l Ammoniumacetat pH 6,7, wobei 6 Peaks gewonnen wurden: Peak II enthielt die Neurophysine, Peak IV B-LPH 1-91,

B-LPH wurde mit Polyacrylamidgelelektrophorese, Isoelektrofokussierung, N- und C-terminaler Aminosäurebestimmung (Woods und Wang 1967, Narita et al. 1975, Boehnert und Schlesinger 1979) und Aminosäureanalyse (Schwandt und Richter 1980) sowie durch Überprüfung der lipolytischen Aktivität an Kaninchenfettzellen (Richter et al. 1979) charakterisiert.

2. Fettgewebsgewinnung

2.1. Präparation isolierter Fettzellen

a) Materialien

Labofuge Typ HC 142 (Fa. Heraeus Christ, Hanau, BRD)

Schüttelwasserbad Typ 108 (Fa. GfL, Hannover, BRD)

Schüttelwasserbad Typ 851502 (Fa. Braun, Melsungen, BRD)

Zählkammer Fuchs-Rosenthal (Fa. Graf, BRD)

Lichtmikroskop (Fa. Will, Wetzlar, BRD)

Meßokular (Fa. Will, Wetzlar, BRD)

Objektträger mit μm -Graduierung (Fa. Will, Wetzlar, BRD)

Filterpapier EA, Porengröße $1,0 \mu\text{m}$, Nr. EAW 02500

(Fa. Millipore, Bredford, Mass., USA)

Vielfachfiltriergerät Nr. XX2702550 (Fa. Millipore, s.o.)

Vakuumpumpe Typ PuZ 161 R (Fa. Durr-Dental, Bietigheim, BRD)

Krebs-Ringer-Bikarbonat Stammlösung:

82,55 g NaCl (Nr. 6404, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

4,21 g KCl (Nr. 4936, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

1,92 g KH_2PO_4 (Nr. 4873, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

3,48 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Nr. 5886, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Auffüllen auf 1 l mit bidestilliertem Wasser.

Isotoner Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer, pH 7,4 mit Glucose:

43,6 ml Krebs-Ringer-Bikarbonat Stammlösung (s.o.)

5,3 ml 0,025 mol/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Nr. 2382, Fa. Merck,
Darmstadt, BRD)

84,0 ml 1,3 % NaHCO_3 (Nr. 6329, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

500 mg D(+) Glucose wasserfrei (Nr. 8337, Fa. Merck, s.o.)

387 ml bidestilliertes Wasser.

Isotoner Krebs-Ringer-Hepes-Puffer, pH 7,4 (Huber et al. 1980):

7,42 g NaCl (Nr. 6404, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

350,43 mg KCl (Nr. 4936, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

367,55 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Nr. 2382, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

163,3 mg KH_2PO_4 (Nr. 4873, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

295,77 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Nr. 5886, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

4,766 g Hepes (N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfat)
(Nr. H3375, Fa. Sigma, St. Louis, USA)

Auf 1 l mit bidestilliertem Wasser auffüllen.

Collagenasemedium, pH 7,4:

60 ml Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer oder -Hepes-Puffer
mit verschiedenen Collagenasen (Collagenaseaktivität je-
weils 150 U/ml):

Collagenase CLS I (Nr. 4197, Charge-Nr. 495258, Collage-
naseaktivität 166 U/mg, Fa. Worthington, New Jersey, USA)

Collagenase CLS II (Nr. 4177, Charge-Nr. 131, Collagenase-
aktivität 270 U/mg, Fa. Worthington, New Jersey, USA)

Collagenase hochgereinigt (Charge-Nr. 234/36, Collagenase-
aktivität 24 U/mg, Fa. Calbiochem, San Diego, USA)

Anfangs wurde dem Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer nach der Methode von Chen (1967) entfettetes (fettsäureverarmtes) Albumin in einer Konzentration von 4g/100ml zugesetzt:

Es wurden 100 g Albuminfraktion V vom Rind (Nr. 8076, Fa. Roth, Karlsruhe, BRD) und 50 g gereinigte Aktivkohle in 100 ml bidestilliertes Wasser gelöst, mit 2 N HCl auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt und 1 h bei 4°C gerührt. Danach erfolgte eine Zentrifugation über 2x60 min bei 9000 U/min und 4°C. Der Überstand wurde mit 2 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und 4x8 h bei 4°C gegen bidestilliertes Wasser (je 5 l) dialysiert (Dialyseschläuche Visking 18/32, Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD). Das Dialysat wurde lyophilisiert.

Bei späteren Zellpräparationen wurde Albumin weggelassen ohne Einfluß auf die Überlebenszeit der Fettzellen. Letztendlich wurde Albumin den Zellpräparationen hinzugefügt um als Akzeptor für die Fettsäuren zu dienen, die die parallel durchgeführte Lipolyse hemmen können.

b) Methode

Isolierte Fettzellen wurden nach einer modifizierten Methode gewonnen, die von Rodbell 1964 und Gliemann 1965 beschrieben wurde. Zwei verschiedene Kaninchenrassen wurden verwendet: Belgischer Riese (Körperge-

wicht 4,5 kg - 8 kg) und weiße Neuseeländer (3,2 kg - 7 kg), nur weibliche Tiere.

Die Tiere wurden in der Regel 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt, Wasser durften sie nach Belieben trinken. Es wurden je nach Versuchsanordnung (s. Ergebnisteil) ebenso Versuche mit Kaninchen mit freier Nahrungsaufnahme bis vor Versuchsbeginn oder 72 h nüchtern gesetzten Kaninchen durchgeführt.

Sofort nach Tod und Entblutung der Tiere wurde das perirenale Fettgewebe entnommen und in 37°C temperierten Krebs-Ringer-Bikarbonat- oder -Hepes-Puffer mit pH 7,4 gegeben. Anschließend wurde das Gesamtgewicht des erhaltenen Fettgewebes bestimmt und jeweils 10 g mit einer Schere zerkleinerte Fettgewebstücke in einem Erlenmeyerkolben mit 15 ml Collagenasemedium bei 37°C im Schüttelwasserbad, Schüttelfrequenz 40/min, über 45 min inkubiert.

Nach der Inkubation wurden isolierte Fettzellen mit einem Kunststoffsieb unter vorsichtigem Rühren gewonnen, 1 ml Zellsuspension auf 15 ml Puffer (s.o.) aufgefüllt und 30 Sekunden bei 900 U/min zentrifugiert. Der erhaltene zellfreie Unterstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Zellen erneut in Puffer suspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Die Zellkonzentration wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt: Es wurden 10 Kleinquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Das Volumen über ein Kleinquadrat der Zählkammer betrug $1,25 \times 10^{-5}$ ml. Daraus ergab sich ein Multiplikationsfaktor von 80 000 zur Berechnung der Zellzahl / ml.

Fettzellgrößenbestimmung:

Es wurde der Durchmesser von 30 Zellen mit Hilfe des Meßokulars bestimmt und der Mittelwert errechnet. Der erhaltene Wert wurde mit einem Umrechnungsfaktor (1 Teilstrich des Okulars $\approx 31,25 \mu\text{m}$) multipliziert, der zuvor mit einem Objektträger mit μm -Graduierung ermittelt worden war.

Fettzelltrockengewicht:

Es wurden auf insgesamt drei zuvor gewogene Filterpapiere je 200 μl (das entspricht im Mittel 200 000 Zellen) der Fettzellsuspension mit bekannter Zellzahl / ml gegeben und mit einer Vakuumpumpe die Filter über ein Vielfachfiltriergerät getrocknet, die Filterpapiere erneut gewogen und der Mittelwert aus der Differenz der Gewichte vor und nach Aufgabe der Fettzellsuspension ermittelt.

2.2. Fettgewebsstücke

Alternativ zu Fettzellen wurden auch in Puffer suspendierte Fettgewebsstücke mit einem Gewicht von je 100 mg

zur Inkubation mit B-LPH eingesetzt.

2.3. Fettgewebshomogenat

a) Materialien

Ultraschall Desintegrator Sonifier B 15, Resonator mit Mikrospitze (Nr. 101-148-062, Fa. Branson Sonic Power Company, Danbury, USA)

b) Methode

Fettgewebsstücke mit einem Gewicht von je 100 mg wurden in Puffer gegeben (jeweils 3 g Fettgewebe in 3 ml) und mit Ultraschall mit einem Branson Sonifier homogenisiert (Stärke 5). Der Ultraschall wurde mit einer Pulsiereinrichtung zu je 50 % aktive Ultraschallzeit und 50 % Ruhezeit geteilt, um eine zu starke Erwärmung des Inkubationsmediums zu verhindern, die reine Beschallungszeit betrug 10 Sekunden. Bei der Behandlung von Rattenfettgewebe über 20 Sekunden bei Stärke 7 wurde das Fett extrahiert und emulgiert, wobei subcelluläre Bestandteile intakt blieben (Davidson und Rosett). Mitochondrien wurden nach 10 Sekunden bei Stärke 3 aus Zellen extrahiert. Anschließend wurde das Homogenat vorsichtig über ein Kunststoffsieb gerührt, um übriges Gewebe abzutrennen. Außer Homogenat von Fettgewebsstücken wurde auch Homogenat von Fettzellen zu Degradationsversuchen verwendet.

3. Inkubationsversuche

a) Materialien

Schüttelwasserbad Typ 851502 (Fa. Braun, Melsungen, BRD)

Schüttelwasserbad Typ 108 (Fa. GfL, Hannover, BRD)

Eppendorf - Reaktionsgefäße aus Kunststoff, 1,5ml (Fa.

Netheler und Hinz, Hamburg, BRD)

Zentrifugengläser 10 ml

Isotoner Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer, pH 7,4 (s. B.2.a)

Isotoner Krebs-Ringer-Hepes-Puffer, pH 7,4 (s. B.2.a)

B-LPH vom Schwein (aus eigener Herstellung, s. B.1)

Antipain (Nr. 4062, Fa. Peninsula, San Carlos, Calif., USA)

Ammoniumchlorid (Nr. 1145, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Aprotinin (Nr. 13718, Fa. Serva, Heidelberg, BRD)

Bacitracin (Nr. 14420, Fa. Serva, Heidelberg, BRD)

Chloroquin (Nr. C 6628, Fa. Sigma, St. Louis, USA)

Chymostatin (Nr. 4063, Fa. Peninsula, San Carlos, USA)

EDTA (Nr. 543, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Leupeptin (Nr. 4041, Fa. Peninsula, San Carlos, USA)

Pepstatin A (Nr. 4093, Fa. Peninsula, San Carlos, USA)

b) Methode

Zur Inkubation mit B-LPH wurden sowohl isolierte Fettzellen in Konzentrationen von 5 000 Zellen/ml bis

500 000 Zellen/ml oder Homogenat von isolierten Fettzellen

als auch intakte oder homogenisierte Fettgewebstücke

von 100 mg, insgesamt 200 bis 600 mg in 1 ml

Inkubationsmedium verwendet. Das Inkubationsmedium be-

stand aus 500 μ l des o.a. Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffers oder 500 μ l des Krebs-Ringer-Hepes-Puffers pro Probe, pH 7,4.

Pro Probe wurden 100 μ g B-LPH in 100 μ l Probenpuffer aufgelöst hinzugegeben, daraus folgte ein Gesamtvolumen pro Probe von 600 μ l. Es wurden also 10 nmol B-LPH eingesetzt. Alle Inkubationsversuche fanden im Schüttelwasserbad bei 37°C und einer Schüttelfrequenz von 40/min statt.

Sowohl Einzelproben in Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden untersucht mit zeitabhängigem Reaktionsstop als auch in den angegebenen Konzentrationsverhältnissen größere Mengen in Zentrifugengläsern mit zeitabhängiger Entnahme von Aliquots (600 μ l) mit unmittelbarem Reaktionsstop.

Die Inkubationsdauer betrug minimal 30 sec, maximal 60 min. Dem Inkubationsmedium wurde vor Zugabe von B-LPH verschiedene Proteasenhemmer hinzugefügt, wie Antipain, Ammoniumchlorid, Aprotinin, Bacitracin, Chloroquin, Chymostatin, EDTA, Leupeptin und Pepstatin A, die Mindestkonzentrationen entsprachen einem Verhältnis Proteasenhemmer zu B-LPH von 2:1, maximal wurden Konzentrationen bis zu 1 mol/l Proteasenhemmer eingesetzt.

Proben nur mit Puffer und B-LPH ohne Fettgewebe, Proben mit Fettzellen, Fettzellhomogenat, Fettgewebsstücken

und Fettgewebshomogenat in Puffer ohne β -LPH, Proben mit Puffer, β -LPH und Proteasenhemmer ohne Fettgewebe wurden zur Kontrolle herangezogen.

4. Inkubationsende

Zur Beendigung der Inkubation wurden verschiedene Methoden angewandt:

4.1. Zentrifugieren mit Filtrationsmembranen

a) Materialien

Labofuge HC 142 (Fa. Heraeus Christ, Hanau, BRD)
Centriflo-Membran CF 25 Kegel (Fa. Amicon, Lexington, USA)
Kunststoffmembranträger CST 1 (Fa. Amicon, Lexington, USA)
mit Auffanggefäß

b) Methode

Die Membran ist durchlässig für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 25 000. Nach Abkühlen der Probe in eiskaltem Wasser wird 15 min bei 3000 U/min über die zuvor 1 h gewässerten Membranen zentrifugiert. Es können bis zu vier Proben gleichzeitig gewonnen werden.

4.2. Absaugen über Filterpapier mit Vielfachfiltrations- gerät

a) Materialien

Vielfachfiltrationsgerät, Filterpapier EA, Vakuum-
pumpe (s. B 2.1.a)

b) Methode

Nach Abkühlen der Probe in eiskaltem Wasser wurde sie
im Vielfachfiltrationsgerät auf das Filterpapier pi-
pettiert und über 5 min unter dem Filterpapier ein Va-
kuum erzeugt, die Probe wurde in einem Auffanggefäß
gesammelt. Es konnten gleichzeitig bis zu 12 Proben
gewonnen werden.

4.3. Zentrifugieren und Absaugen des Unterstandes

a) Materialien

Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml und Eppendorf Zentri-
fuge 3200 (Fa. Netheler und Hinz, Hamburg, BRD)

b) Methode

Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden sie bei 12 000
U/min über 2 min zentrifugiert und nach erneutem Küh-
len in eiskaltem Wasser wurde der feste Zell- oder Ho-
mogenatüberstand mit einer Pipettenspitze vorsichtig
beiseite geschoben und der Unterstand herauspipettiert.

4.4. Zusatz von Orthophosphorsäure

Bei Entnahme des Aliquots sofortige Zugabe von 0,5 bis
20 µl Orthophosphorsäure (Nr. 573, Fa. Merck, Darmstadt,

BRD) und weiteres Vorgehen wie unter 4.3.

4.5. Zusatz von Dinonylphthalat

Abkühlung der Probe, die sich in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß befand, auf Eis unter sofortiger Zugabe von 150 µl Dinonylphthalat (Nr. 669, Fa. Merck, Darmstadt, BRD) (Gliemann et al. 1978). Danach Zentrifugation bei 8000 g über 2 min, wobei sich das Öl zwischen Zellüberstand und zellfreiem Unterstand einstellte (entsprechend bei Homogenat oder Fettgewebstücken). Der Unterstand wurde mit einer Einmalspritze und einer Einmalkanüle (0,7 mm Außendurchmesser) durch Durchstechen des Kunststoffreaktionsgefäßes abgesaugt. Der Unterstand wurde sofort bei -40°C bis zur weiteren Analyse tiefgefroren.

5. Analytische Methoden

5.1. Acrylamidgelelektrophorese (Allen und Maurer, 1974)

a) Materialien

Elektrophoresekammer 2117 Multiphor (Fa. LKB, Bronna, Schweden)

Netzanschlußgerät 2103 (Fa. LKB, Bronna, Schweden)

Gelplattenformer (Fa. LKB, Bronna, Schweden)

Kühlaggregat MC 3 (Fa. Colora, Lorch, BRD)

Lyophilisator Delta (Fa. Christ, Osterode am Harz, BRD)

Mikroliterspritze A-RN 10 µl (Fa. SGE, Melbourne, Australien)

Multi-Microultrafiltrationssystem MMCA (Nr. 5410, Fa.

Amicon, Lexington, Mass., USA)

Diaflo-Ultrafiltrationsmembran UM 05 (Fa. Amicon, Lexington, Mass. USA)

Elektrophorese-Scanner 1310 (Fa. Colora, Lorch, BRD)

ISCO Absorptionsmonitor UA 5 mit optischer Einheit (Fa. Colora, Lorch, BRD)

Trägerplatten 1317 (Fa. Colora, Lorch, BRD)

Tris-Glycin-Puffer-Stammlösung pH 8,9:

75,1 g Glycin (Nr. 4201, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

2,5 g Natriumacetat (Nr. 6265, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Auf 3 000 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen, dann mit Tris (Trishydroxymethylaminomethan, Nr. 8382, Fa. Merck, Darmstadt, BRD) auf pH 8,9 titrieren, schließlich mit bidestilliertem Wasser auf 5 000 ml auffüllen.

Elektrodenpuffer:

Tris-Glycin-Puffer-Stammlösung und bidestilliertes Wasser im Verhältnis 1:1, insgesamt 2,4 l.

Probenpuffer:

5 ml Tris-Glycin-Puffer-Stammlösung auf 100 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen.

Probenlösung:

10 µl Probenpuffer

10 µl Glycerin (Nr. 4091, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

+5 µl Bromphenolblau 0,25 % (Nr. 8122, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Acrylamidlösung:

22,2 g Acrylamid (Nr. 10675, Fa. Serva, Heidelberg, BRD)
+ 0,6 g Bis (N,N'-Methylen-bis-acrylamid, Nr. 87800,
Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)

Mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen, danach
filtrieren.

Ammoniumpersulfat-Lösung:

150 mg Ammoniumperoxidsulfat (Nr. 1201, Fa. Merck, Darm-
stadt, BRD)

Auf 10 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen.

Gel-Lösung (Gelkonzentration 7,5 %):

33,0 ml Tris-Glycin-Puffer-Stammlösung

22,2 ml Acrylamidlösung

3,2 ml Ammoniumpersulfat-Lösung

7,5 ml bidestilliertes Wasser

+ 0,1 ml TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-acethylendiamin
purum, Nr. 87689, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)

Essigsäure (Nr. 63, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Trichloressigsäure (Nr. 807, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Amidoschwarz (Nr. 1167, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Coomassie Blue R-250 (Nr. 35051, Fa. Serva, Heidelberg, BRD)

BSA (Nr. A4378, Fa. Sigma, St. Louis, USA)

b) Methode

5.1.b.1. Entsalzen mit Ultrafiltrationsmembran

Zur Elektrophorese wurden die Proben über Ultrafiltra-
tionsmembranen entsalzt, da der Salzanteil zur Lösung
in der geringen Menge von Probenpuffer (25 µl) zu hoch

war. Die Membranen sind durchlässig für Moleküle mit einem Molekulargewicht bis 500. Die Proben wurden mit dem fünffachen Volumen an bidestilliertem Wasser verdünnt und bei 4°C mit einem Druck auf die Membranen von 1,3 atü ultrafiltriert. In dem verwendeten Gerät konnten gleichzeitig acht Proben ultrafiltriert werden, dabei könnten theoretisch bis zu 99 % des Salzes entfernt werden. Anschließend wurde die Probe lyophilisiert.

5.1.b.2. Gelherstellung

Die Gellösung wurde nach Entlüften in einer Saugflasche mit der Wasserstrahlpumpe mit einer Spritze in den Gelplattenformer eingefüllt und 40 min unter UV-Licht bei Raumtemperatur polymerisiert, danach bis zur Verwendung mindestens 12 h bei 4°C gelagert.

5.1.b.3. Durchführung der Elektrophorese

Es handelte sich hier um eine kontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese auf horizontalen Flachbettgelen mit Tris-Glycin-Puffer, pH 8,9, die Stromstärke betrug 40 mA bei konstanter Spannung, die Feldstärke betrug 15 V/cm. Die Gesamtlaufzeit bei einer Kühlung des Gels auf 10°C war 3 h, bzw. betrug die Wanderungsgeschwindigkeit von Bromphenolblau als Indikator 1,8 cm/h.

Zunächst erfolgte eine Vorelektrophorese mit 50 mA über 30 min, um Verunreinigungen im Gel vorlaufen zu lassen.

Das aus den ultrafiltrierten Inkubationsproben erhaltene Lyophilisat wurde in 25 µl der Probenlösung aufgelöst. Davon wurden 10 µl mit einer Mikroliterspritze aufgetragen. Mit einem Strom von 20 mA über 10 min wurden die Proben an der Auftragsstelle konzentriert, erst dann erfolgte der eigentliche Lauf wie oben angegeben.

5.1.b.4. Fixieren und Färben

Das Gel wurde zur Fixierung 30 min lang in eine 12,5 % Trichloressigsäure gelegt. Die Färbelösung bestand aus 12,5 % Trichloressigsäure und 1 % Coomassie-Blue-Lösung im Verhältnis 20:1. Es wurde 1 h lang gefärbt und etwa 12 h mit 10 % Trichloressigsäure entfärbt.

Verschiedene Gele wurden mit Amidoschwarz gefärbt, wobei in einer Lösung aus 7 % Essigsäure und 1 % Amidoschwarz 45 min gleichzeitig fixiert und gefärbt wurde. Entfärbt wurde in 7 % Essigsäure 1 - 2 Tage lang unter häufigem Wechsel des Entfärbekades.

5.1.b.5. Scannen der Gele

Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurden die Gele bei einer Wellenlänge von 280 nm gescannt. Dazu wurden die Gele in Streifen geschnitten und auf Trägerplatten aus Glas gelegt. Diese wurden mit einer Geschwindigkeit von 30 cm/h an der Meßzelle in der optischen Einheit vorbeigefahren. Als Referenz wurde

gegen die Extinktion durch eine Glasplatte und Luft gemessen. Die Schreibergeschwindigkeit betrug 30 cm/h.

5.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

a) Materialien

Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat (Nr. 6346, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Methanol (Nr. 6007, Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Hochreines Wasser aus Milli Q Typ I reagent water system (Fa. Millipore, El Paso, Texas, USA)

HPLC-Anlage 1:

2 Hochdruckpumpen Altex 110 A

UV-Spectrophotometer Uvikon 725

Probengeber ASI 45

Probenaufgabeventil Rheodyne Modell 7125

Recorder W+W 1107

Mischkammer Altex 400

Programmierer Altex 420

Probensammler FRAC-300

HPLC-Anlage 2:

2 Hochdruckpumpen LC 410

UV-Spectrophotometer Uvikon 720 LC

Recorder Uvikon 21

Probengeber MSI 660 mit Probenaufgabeventil

Mischkammer K 800

Programmierer Kontron 200

Trennsäulen:

Lichrosorb RP 18 (Fa. Merck, Darmstadt, BRD)

Aquapore RP 300

Vorsäule Aquapore RP 300

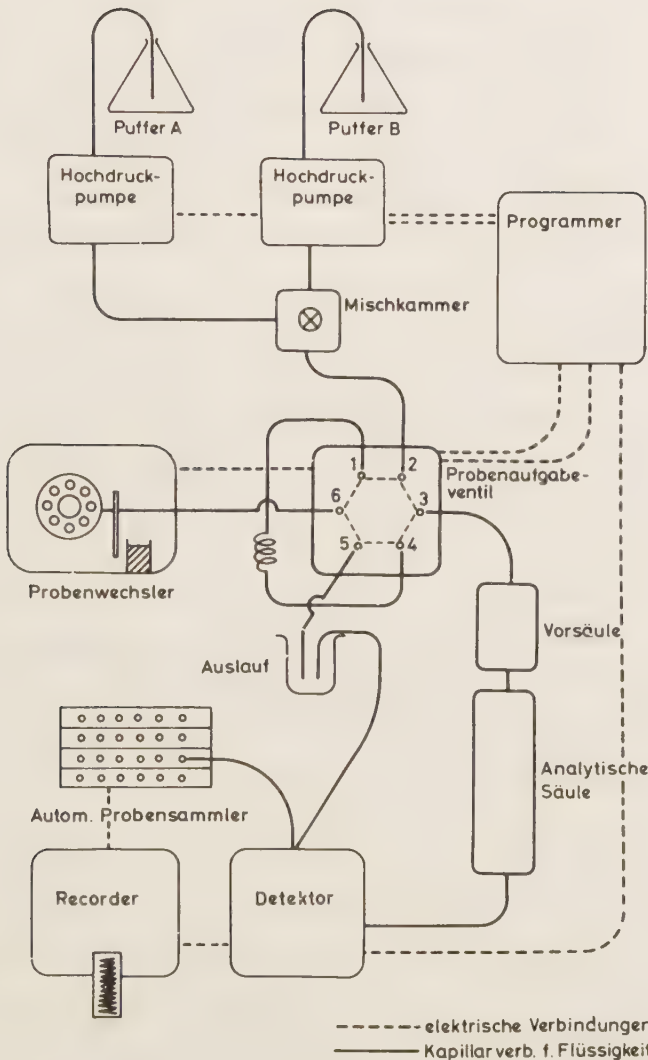
Alle Geräte außer der Säule Lichrosorb RP 18 wurden von der Fa. Kontron, Eching, BRD, bezogen.

b) Methode

5.2.b.1. Analyse von Peptidmischungen

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgte nach dem Verfahren der Gradientelution mit Gradientmischung auf der Hochdruckseite. Als Gradientelution bezeichnet man die programmierte Erhöhung der Elutionskraft des Eluenten, wodurch besonders Gemische mit weitgestreuter Polarität wie z.B. verschiedene Peptidhormone gut aufgetrennt werden können. Nicht nur die zu Beginn der Trennung eluierten Substanzen stellen sich als schmale Peaks dar, sondern auch die bei unveränderten Eluenten stark zurückgehaltenen Probenbestandteile werden als scharf abgegrenzte Peaks in wesentlich verkürzter Zeit eluiert (Engelhardt 1977).

Abbildung 5 zeigt das Schema der eingesetzten HPLC-Anlagen: Zwei Hochdruckpumpen fördern aus den beiden Lösungsmittelreservoirs Puffer A und Puffer B. Die beiden Kurzhub-Kolbenpumpen werden über einen Programmierer elektronisch so gesteuert, daß die Gesamtfördermenge mit 1 ml/min unverändert bleibt, während die Fördermenge der Einzelpumpen gegenläufig verändert wird.



HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE-ANLAGE

Abbildung 5: Schema einer HPLC-Anlage (Erläuterung s. Text)

Als Puffer A fand Methanol Verwendung, Puffer B war 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2,1. Es wurde ein linearer Gradient von 20 % Puffer A auf 65 % Puffer A hergestellt, die Laufzeit betrug 180 min für die Lichrosorb RP 18 Säule, 120 min für die Aquapore RP 300 Säule. Jeder Gradientelution ging eine Äquilibration der Säule über 20 min mit dem Eluentenausgangsgemisch voraus.

Auf eine Dämpfung der Pulsationen des Eluentenmittelstromes, zwangsläufig durch die Kolbenhübe verursacht, konnte in diesem System ohne nennenswerte Nachteile für die Analyse verzichtet werden.

Durch die Mischung der Eluenten auf der Hochdruckseite wurde durch kürzere Wege zwischen Mischkammer und Säule und fehlender Vermischung in den Pumpen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessert.

Von der Mischkammer gelangt die mobile Phase über das Probenaufgabeeventil auf die Säulen. Durch den Einsatz eines Probenwechslers konnten automatisch mehrere Proben aufgegeben werden, wobei eine Probenschleife mit einem Volumen von 100 µl aufgefüllt wurde. Ohne wesentliche Vermischung wurde die Probe mit dem Eluentengemisch aus der Probenschleife gespült. Die Probenschleife wurde mit Methanol nachgespült, das Spülmittel wurde bei einer veränderten Ventilstellung in einen Auslauf gepumpt.

Über die analytische Säule und eine eventuell vorgeschaltete Vorsäule lief das Eluentengemisch durch den Detektor, ein UV-Spectrophotometer mit variabler Wellenlänge. Die Photometerzelle hatte eine Schichtdicke von 10 mm bei einem Volumen von 7 μ l, die Detektion erfolgte bei 225 nm.

Die Schreibergeschwindigkeit betrug bei Anlage 1 15 cm/h, bei Anlage 2 12 cm/h. Einer Papierbreite von 25 cm entsprach einer Extinktion von 0,1. Bei präparativen Arbeiten konnte zusätzlich ein automatischer Fraktions-sammler angeschlossen werden.

Über einen programmierbaren Mikroprozessor wurden die Hochdruckpumpen zur Gradientherstellung, der Probenwechsler mit Probenaufgäbeventil gesteuert, so daß automatische Analysen mehrerer Proben über 24 Stunden möglich waren.

Die zur Analyse verwendeten Trennsäulen Lichrosorb RP 18 und Aquapore RP 300 bestanden aus Edelstahlrohren mit einem inneren Durchmesser von 0,42 bzw. 0,4 cm und einer Länge von 25 cm. Sie trennten nach dem Prinzip der Adsorptionschromatographie mit einem "reversed-phase"-System (Umkehrphase). Demnach ist die mobile Phase (s.o.) polar, während das Packmaterial (stationäre Phase) aus porösem Kieselgel ($\text{Si}(-\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$) besteht, das mit Octadecylsilikanen umgesetzt ist und durch die Abschirmung der Silanolgruppen unpolar ist. Die funk-

tionelle Gruppe befindet sich am C_{18} -Atom. Die Teilchengröße beträgt bei beiden Säulen $10\text{ }\mu\text{m}$, die Porengröße bei der Lichrosorb RP 18 Säule $50 - 100\text{ }\text{\AA}$, während die Aquapore RP 300 Säule eine Porengröße von $300\text{ }\text{\AA}$ aufweist. Die später eingesetzte Aquapore RP 300 zeigte durch die höhere Porengröße ein besseres Auflösungsvermögen der Peptide, insbesondere auch in dem Bereich höherer Molekulargewichte über $20\,000$ (s. Abbildung 6 und 7).

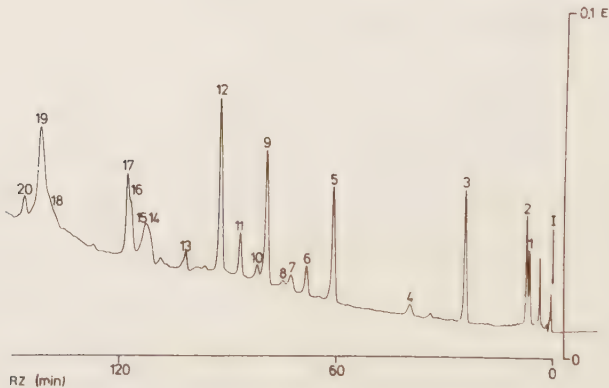


Abbildung 6: Auftrennung eines Gemisches von 20 Proopiomelanocorticotropinpeptiden über eine Lichrosorb RP 18 Säule. Linearer Gradient von 20 % auf 75 % Puffer A in 180 min. A = Extinktion, I = Probenaufgabe. 1) B-LPH 88-91; 2) B-LPH 39-45; 3) ACTH 1-4; 4) B-LPH 1-10; 5) B-LPH 61-65; 6) ACTH 4-10; 7) Leu-Enkephalin; 8) B-MSH Schwein; 9) ACTH 1-24; 10) B-LPH 61-76; 11) B-MSH Human; 12) ACTH 1-13; 13) γ -MSH; 14) ACTH 18-39; 15) B-LPH 61-77; 16) ACTH Schwein; 17) B-LPH 66-89; 18) B-LPH 66-91; 19) B-LPH 61-91; 20) B-LPH Human (Richter und Schwandt 1985).

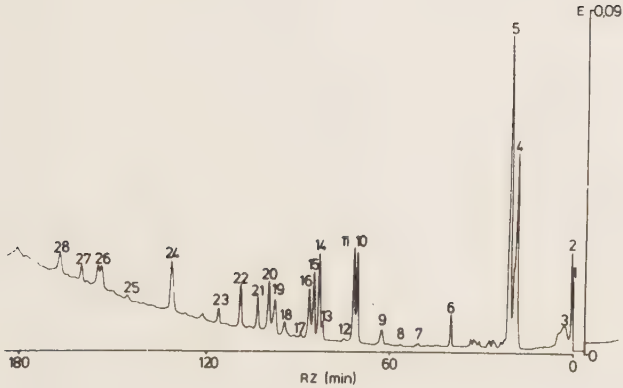


Abbildung 7: Auftrennung eines Gemisches von 27 Peptiden über eine Aquapore RP 300 Säule. Linearer Gradient von 10 % auf 65 % Puffer A in 180 min. A = Extinktion. Menge pro Peptid 500 - 1500 ng. 1) Prolaktin; 2) hGH; 3) LH; 4) FSH; 5) TSH; 6) TRH; 7) β -LPH 88-91; 8) ACTH 1-4; 9) β -LPH 1-10; 10) β -LPH 39-45; 11) ACTH 4-11; 12) β -LPH 61-65; 13) LRF-Kontamination; 14) β -LPH 62-91; 15) LRF; 16) β -LPH 66-91; 17) Leu-Enkephalin; 18) β -MSH Schwein; 19) ACTH 4-10; 20) ACTH 1-24; 21) β -LPH 61-76; 22) ACTH 1-13; 23) γ -MSH; 24) ACTH 18-39; 25) ACTH Schwein; 26) β -Endorphin Human; 27) β -LPH 66-89; 28) β -LPH Human (Richter und Schwandt 1985).

Die Analysen wurden immer bei Raumtemperatur, die durch eine Klimaanlage konstant gehalten wurde, durchgeführt. Die HPLC-Anlage wurde mit 20 Teilsequenzen des Proopiomelanocorticotropin kalibriert. Jedes Peptid wurde dreimal aufgegeben, die Retentionszeiten wichen weniger als 10 sec voneinander ab (Richter und Schwandt 1985). Die Peptidstandards wurden in Puffer B (0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer, pH 2,1) aufgelöst, je Peptid 500 - 1500 ng.

ACTH 1 - 39 (Schwein)	(Fa. Serva, Heidelberg, BRD)
ACTH 1 - 24 synth.	(Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)
ACTH 1 - 13 synth.	(Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)
ACTH 1 - 4 synth.	(Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)
ACTH 4 - 10 synth.	(Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)
ACTH 4 - 11 synth.	(Fa. Peninsula, San Carlos, USA)
ACTH 18 - 39 synth.	(Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)
B-LPH 1 - 89 (Human)	(Präpariert n. Richter und Schwandt 1981)
B-LPH 1 - 91 (Schwein)	(Präpariert n. Richter und Schwandt 1981)
B-LPH 1 - 10 synth.	(Fa. Paesel, Frankfurt, BRD)
B-LPH 39 - 45 synth.	(Fa. Paesel, Frankfurt, BRD)
B-LPH 61 - 65 synth.	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
B-LPH 61 - 76 synth.	(Fa. Serva, Heidelberg, BRD)
B-LPH 62 - 91	(Geschenk von Dr. Höllt, Max-Planck-Institut für Psychiatrie)
B-LPH 66 - 89	(Dr. Morley, ICI, England)
B-LPH 66 - 91	(Dr. Morley, ICI, England)
B-LPH 88 - 91	(Dr. Morley, ICI, England)
B-Endorphin (synth., Hum.)	(Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)
B-MSH (synth., Human)	(Fa. Peninsula, San Carlos, USA)
B-MSH (synth., Schwein)	(Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz)
γ -MSH synth.	(Fa. Paesel, Frankfurt, BRD)
Leu-Enkephalin synth.	(Fa. Sigma, St. Louis, USA)
FSH	(Fa. Serva, Heidelberg, BRD)
hGH	(Fa. Nordisk, Kopenhagen, Dänemark)
LH	(Fa. Serva, Heidelberg, BRD)
LRF (LH-RH) synth.	(Fa. Höchst, Frankfurt, BRD)
TRH synth.	(Fa. Serva, Heidelberg, BRD)
TSH	(Fa. Serva, Heidelberg, BRD)

Tabelle 1: Für die HPLC-Trennung verwendete Peptide.

Die zu untersuchenden Proben wurden ohne weiteren Reinigungsschritt aufgegeben. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Vorsäule mit dem gleichen Packmaterial der analytischen Säule benutzt, um höhermolekulare Substanzen (Molekulargewicht über 25 000) aus dem Fettgewebe zurückzuhalten. Bei einer Leerwertprobe gelangten bei der 100 µl-Probenschleife 16,7 µg B-LPH (100 µg B-LPH in 600 µl Puffer) zur Aufgabe.

Der verwendete Puffer B (Natriumphosphatpuffer) besitzt einen hohen Salzgehalt, wodurch die Retentionszeiten verkürzt wurden. Die Zugabe von reiner Orthophosphorsäure reduzierte weiter die Retentionszeiten und war für die gute Reproduzierbarkeit verantwortlich, möglicherweise durch eine Zunahme der Polarität der Peptide.

Zunächst war bidestilliertes Wasser (im Labor gewonnen) für die Herstellung des Phosphatpuffers genommen worden. Es zeigten sich jedoch während des Laufes bei zunehmendem Anteil von Phosphatpuffer im Gradienten Kontaminationen der mobilen Phase, sodaß später nur hochgereinigtes Wasser aus einem Milli Q Water System verwendet wurde.

5.2.b.2. Präparative Auftrennung der B-LPH-Spaltstücke

Die nach Inkubation von B-LPH mit intaktem Fettgewebe und Fettgewebshomogenat neu aufgetretenen Peptidpeaks wurden mit Hilfe der zuvor beschriebenen Umkehrphasen-

-HPLC vollständig getrennt und gesammelt. Elutionsmittel Puffer A war wiederum Methanol, Puffer B in diesem Fall 0,001 mol/l Natriumphosphatpuffer mit einem pH von 2,1. Die präparative Auftrennung erfolgte bei Raumtemperatur über 60 min mit einem linearen Gradienten von 45 % auf 55 % Puffer A. Durch diese Laufbedingungen wurde, verglichen mit der analytischen Methode, eine Verbesserung der Trennung erreicht, allerdings auch eine Verbreiterung der neu aufgetretenen Peaks hingenommen (Abbildung 8). Durch die Verdünnung des Natriumphosphatpuffers um den Faktor 100 konnte der Salzgehalt der gesammelten Proben auf Kosten der Retentionszeit deutlich vermindert werden.



Abbildung 8: Präparative Auftrennung der B-LPH-Spaltstücke mit der HPLC. Laufbedingungen s. Text. Trennsäule Aquapore RP 300 mit Vorsäule.

Mit einem automatischen Probensammler wurden bei einer Flußrate von 1 ml/min Fraktionen zu je 3 ml gesammelt. Zur weiteren Analyse wurden die erhaltenen Fraktionen

lyophilisiert. Im Labor wurden die neu aufgetretenen Peaks nach Entsalzung mit hochauflösender Gelpermeationschromatographie (Richter und Schwandt 1984) mittels Aminosäurenanalyse und N-terminaler Aminosäurenbestimmung weiter charakterisiert.

6. Molekulargewichtsbestimmung mit Gelpermeationschromatographie

a) Materialien

Guanidinhydrochlorid - Grade I (Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Hochreines Wasser aus Milli Q Typ I Water System (Fa. Millipore, El Paso, Texas, USA)

Hochdruckpumpe Altex 110 A (Fa. Kontron, Eching, BRD)
Probenaufgabeeventil Rheodyne (Fa. Kontron, Eching, BRD)

Photometer Uvicord S (Fa. LKB, Bronna, Schweden)

Zweikanalrecorder 2210 (Fa. LKB, Bronna, Schweden)

Hewlett-Packard Integrator 3380 (Texas Instruments, USA)

Gelpermeationssäulen:

2 Bio-Sil TSK 125, Nr. 22032 und Nr. 22023 (Fa. Bio-Rad, München, BRD)

Bio-Gel TSK 20, Nr. 14415 (Fa. Bio-Rad, München, BRD)

b) Methode

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde als Ausschlußchromatographie entweder mit 1 Bio-Gel TSK 20 - oder mit 2 Bio-Sil TSK 125 - Säulen durchgeführt. Die TSK 125 - Säulen wurden zur Vergrößerung des wirksamen Porenvolumen und damit der Trennleistung hintereinander geschaltet.

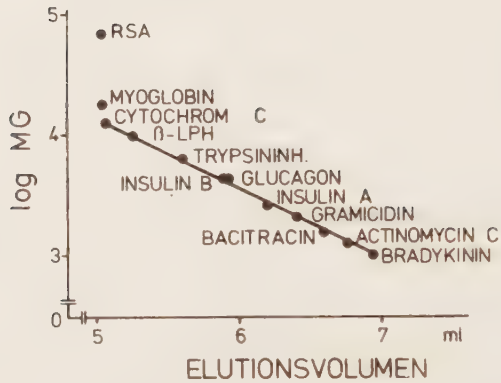


Abbildung 9: Kalibrierung einer TSK 20 Säule mit verschiedenen Peptid- und Proteinmolekulargewichtsstandards. Steigung der Geraden $y = 6,987 - 0,576 x$, Korrelationskoeffizient $r = 0,997$. MG = Molekulargewicht, RSA = Rinderserum-Albumin, Trypsin-Inh. = Trypsin-Inhibitor

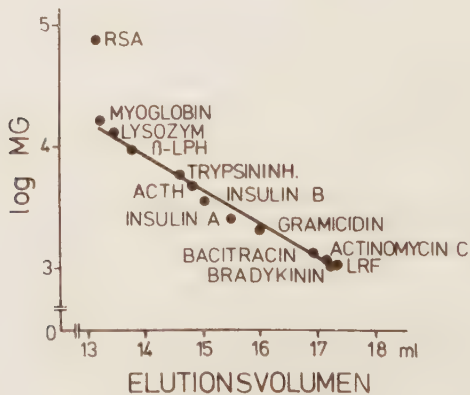


Abbildung 10: Kalibrierung einer TSK 125 Säule mit verschiedenen Peptiden und Proteinen. Steigung $y = 7,89 - 0,283 x$, Korrelationskoeffizient $r = 0,98$. Abkürzungen s. Abbildung 9

1	Rinderserum-Albumin	69 000
2	Myoglobin	17 800
3	Lysozym	14 400
4	Cytochrom C	12 300
5	B-LPH (Schwein)	10 200
6	Trypsin-Inhibitor	6 000
7	ACTH (Schwein)	4 500
8	B-Endorphin	3 466
9	Insulin-B-Kette	3 495
10	Glucagon	3 483
11	ACTH 1 - 24	2 934
12	Insulin-A-Kette	2 532
13	Gramicidin	2 000
14	α -MSH	1 665
15	Bacitracin	1 450
16	ACTH 1 - 10	1 299
17	Actinomycin C	1 280
18	LRF	1 182
19	ACTH 4 - 11	1 090
20	Bradykinin	1 060
21	Cathepsin D	849
22	PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg	777
23	DNP-Alanin	255

Tabelle 2: Standardpeptide und -proteine und ihre Molekulargewichte. Bezugsquellen: 1 Fa. Roth, Karlsruhe, BRD, 2/3/4/7/9/10/12/13/15/17/22/23 Fa. Serva, Heidelberg, BRD, 6/21 Fa. Sigma, St. Louis, USA, 8/11/14 Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz, 16/19 Fa. Peninsula, San Carlos, USA, 18 Fa. Höchst, Frankfurt, BRD, 20 Fa. Paesel, Frankfurt, BRD, 5 präpariert nach Richter und Schwandt 1981.

Die Länge der Säulen betrug jeweils 30 cm, der innere Durchmesser 7,5 mm. Das TSK 125 Trennmaterial bestand aus durch Silanoyl-Gruppen modifiziertes Kieselgel, das TSK 20 Material aus Kieselgel mit hydroxylierten Polyäthern. Als Laufmittel wurde bei allen Säulen 6 mol/l Guanidinhydrochlorid verwendet, das über eine Metallfritte mit einer Porengröße von 15 μ m filtriert wurde. Die Flußrate der mit einem speziellen Pulsdämpfer ausgestatteten Hochdruckpumpe betrug 1 ml/min, die Peptide und Proteine (5 - 50 μ g / Probe) wurden in 100 μ l des Laufmittels gelöst und manuell über ein Aufgabeeventil aufgetragen.

Die Detektion erfolgte bei 279 nm in einem Uvicord S Photometer, das mit einem Zweikanalrecorder und einem Integrator verbunden war. Die Trennsäulen wurden täglich vor der ersten Analyse 2 h lang mit dem Laufmittel äquilibriert.

Abbildung 9 zeigt die Elutionspositionen der Peptide und Proteine bei Verwendung der TSK 20 Säule, Abbildung 10 für eine TSK 125 Säule.

Bei der TSK 20 Säule waren die Logarithmen der Molekulargewichte der Standards (Aufstellung der Peptide und Proteine mit ihrem Molekulargewicht in Tabelle 2) zwischen 1 000 und 10 000 invers korreliert mit den Retentionszeiten. Die TSK 125 Säule erlaubte zwar auch eine zufriedenstellende Trennung der Standards im Molekular-

gewichtsbereich zwischen 1 000 und 17 800, es fand sich aber keine so gute Korrelation wie bei der TSK 20.

Bei der TSK 20 Säule wich keines der Peptide um mehr als 5 % seines Molekulargewichtes von der kalkulierten Regressionsgeraden ab, die Variationen an einem Tag lagen pro Peptid im Bereich zwischen 1 und 2 %. Die TSK 125 Säule erlaubte eine Molekulargewichtsbestimmung im Bereich zwischen 1 000 und 10 000 mit einer Genauigkeit von ± 15 % und zwischen 1 000 und 17 800 von ± 20 %. Die Variationen an einem Tag lagen zwischen 0,9 und 2,2 %.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte im Bereich zwischen 800 und 3 500 wurden zwei TSK 125 Säulen kombiniert (Abbildung 11). Dabei lagen die Peptide mit ihrem Molekulargewicht mit Ausnahme von LRF (10 %) im Bereich von ± 5 % neben der errechneten Regressionsgeraden. Die Variationen an einem Tag lagen zwischen 1 und 1,9 %.

Für alle Bestimmungen der Retentionszeiten der Peptide lag die Variation an einem Tag zwischen 0,1 und 0,44 %. Dies entspricht Variationen des Molekulargewichtes zwischen 0,9 und 2,2 % (Tabellen 3 und 4). Die Tag-zu-Tag-Variation der Standards lag maximal bei 0,63 %, die mit 5 Peptiden erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Abbildung 12 zeigt die Trennung von 7 Peptiden im Mole-

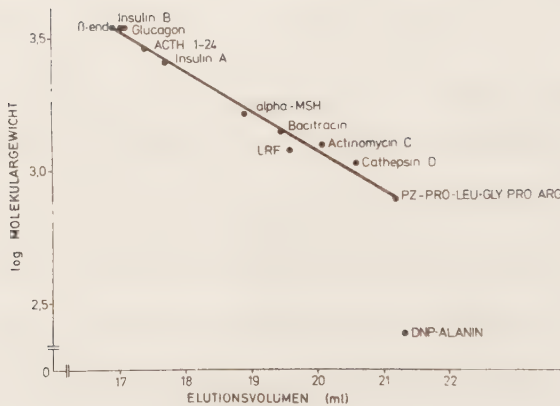


Abbildung 11: Kalibrierung zweier kombinierter TSK 125 Säulen mit Peptid- und Proteinmolekulargewichtsstandards. Steigung der Geraden: $y = 6,14 - 0,154 x$, Korrelationskoeffizient $r = 0,991$. B-end = B-Endorphin.

kulargewichtsbereich zwischen 1060 und 3500 mit einer TSK 20 Säule. Diese Abbildung, ebenso wie Tabelle 4, zeigt, daß Peptide, die sich in ihrem Molekulargewicht nur um 150 bis 200 unterscheiden, mit dieser Säule getrennt werden konnten und daß die Differenz der Retentionszeiten die Standardabweichung bei weitem übertrifft. Andererseits zeigt diese Abbildung, daß Peptide mit nahezu identischem Molekulargewichten auch identische Retentionszeiten hatten.

Als Indikator für unspezifische Adsorption wurde die hydrophobe Substanz Indol benutzt. Sie eluierte bei der gleichen Retentionszeit wie andere Marker des

Tabelle 3

Retentionszeiten (in Sekunden) von 5 Peptiden auf der Bio-Gel TSK 20 Säule

	Molekulargewicht				
	1 280	1 450	2 934	10 200	12 300
1	403,2	396,6	366,0	315,0	310,2
2	404,4	397,8	364,8	314,4	309,6
3	403,2	396,6	364,2	315,0	309,6
4	403,8	396,0	366,6	314,4	310,8
5	402,0	396,0	366,6	315,0	309,6
	403,3 + 0,88	396,6 + 0,73	365,6 + 1,08	314,7 + 0,33	309,9 + 0,53

Mittelwert + Standardabweichung aus 5 Bestimmungen an einem Tag.

Tabelle 4

Retentionszeiten (in Sekunden) von 5 Peptiden auf der Bio-Sil TSK 125 Säule: Variationen pro Tag und Tag-zu-Tag-Variation

	Molekulargewicht			
	1 280	1 450	2 532	14 300
Tag 1	1032,0 + 3,0	1010,0 + 3,2	942,0 + 3,4	813,0 + 3,2
Tag 2	1029,6 + 2,8	1008,6 + 2,9	936,0 + 2,7	810,0 + 3,6
Tag 3	1031,4 + 3,2	1011,0 + 1,8	936,0 + 3,2	805,2 + 3,2

Mittelwert + Standardabweichung aus 5 Bestimmungen an einem Tag.

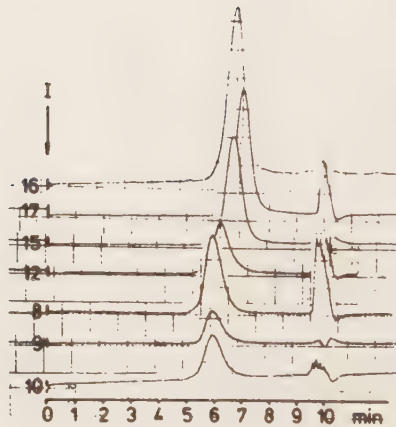


Abbildung 12: Chromatogramme von 7 Peptiden nach Elution von einer TSK 20 Säule. Drei Peptide mit ähnlichem Molekulargewicht (3500): (10) = Insulin-B-Kette, (9) = Glucagon, (8) = β -Endorphin (Mensch), (12) = Insulin-A-Kette, (15) = Bacitracin, (17) = Bradykinin, (16) = Actinomycin C. Bei Retentionszeiten zwischen 9 und 10 min eluieren die in den Peptidproben enthaltenen Salze. I = Injektion, Detektion bei 280 nm, Schreibereinstellung: Vollausschlag = 0,05 E.

totalen Elutionsvolumen (Essigsäure, DNP-Alanin). Die Peaksymmetrie (Abbildung 12) zeigt ebenfalls, daß nur eine geringe unspezifische Adsorption vorlag.

Da die Variationen pro Tag gering waren, mußte während eines Arbeitstages die Säule nicht rekali­briert werden. Zum Ausschluß von Tag-zu-Tag-Variationen wird die tägliche Eichung der Säule mit 4 verschiedenen Standards empfohlen.

7. Analysenauswertung

Die Degradation von β -LPH wurde aus dem Unterstand der Inkubationsproben (s. 4.) mit Hilfe der HPLC analysiert und quantitativ als Abnahme von nicht degradiertem β -LPH ausgedrückt. Wie bei allen chromatographischen Verfahren ist die Peakfläche der aufgegebenen Probenmenge proportional. Analog zur Gaschromatographie (Karger et al. 1973) kann die Peakhöhe, Peakhöhe mal Halbwertsbreite, die Fläche, die Integration mittels Disc-Integrator oder elektronischem Integrator verwendet werden. Die Anzeige der Detektoren in der HPLC ist konzentrationsspezifisch. Durch den Schreiber wird die Änderung der Konzentration als Funktion der Zeit durch eine Fläche registriert (Engelhardt 1977).

Da die Peaks bei der angewendeten HPLC-Methode gleichschenkelige Dreiecke ohne "tailing" ergaben, wurde die Fläche graphisch ermittelt mit:

$$A = \frac{1}{2} c \cdot h,$$

bzw., da $c = 2 b$ ist:

$$A = b \cdot h.$$

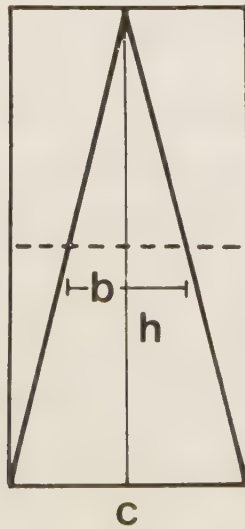


Abbildung 13:

Bei ansteigender Basislinie bei der Gradientelution wurde als Basis c des gleichschenkeligen Dreiecks das Lot auf den Schnittpunkt von h mit der Basislinie gefällt. Der Fehler bei der Flächenbestimmung wird zwischen 1 % und 5 % angegeben (Engelhardt 1977), wobei insbesondere die Probenaufgabe mittels einer Spritze mit Mängeln behaftet ist. Bei Reihenuntersuchungen sollte daher die Probenaufgabe, wie in dieser Auswertung durchgeführt, unbedingt mit einer Probenschleife erfolgen.

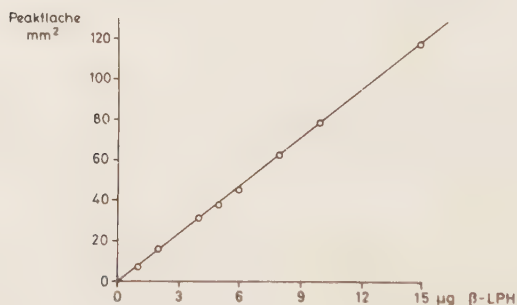


Abbildung 14: Eichkurve des HPLC-Systems mit Aquapore RP 300 Säule mit verschiedenen Mengen von β -LPH (1 - 15 μg)

Abbildung 14 zeigt die Eichkurve des hauptsächlich verwendeten HPLC-Systems mit der Aquapore RP 300 Säule mit verschiedenen Mengen von β -LPH im Bereich von 1 - 15 μg (0,1 - 1,5 nmol). Jede Messung wurde 5 mal durchgeführt. Die Eichkurve ergab in diesem Bereich eine lineare Regression mit der Gleichung $y = 7,8x - 0,81$ und einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,998$.

C. ERGEBNISSE

1. Analysemethoden der Degradation von β -LPH

1.1. Polyacrylamidgelelektrophorese

Zu Beginn der Untersuchungen wurde versucht, die erhaltenen Inkubationsproben mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese pH 8,9 zu analysieren.

Im Vergleich zum Leerwert (β -LPH in Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer, gleiche Inkubationsbedingungen, Lyophilisieren und Auflösen in Probenpuffer) konnte eine Abnahme der β -LPH-Bande gesehen werden (Abbildung 15). Zusätzlich trat eine neue Peptidbande auf, die nur wenig weiter wanderte als β -LPH, möglicherweise ein Abbauprodukt. In der SDS-Gelelektrophorese konnte diese Bande nicht von β -LPH abgegrenzt werden.

Die breite Bande mit der größten Wanderungsgeschwindigkeit, die bei Proben mit intaktem Fettgewebe und Fettgewebshomogenat gleichermaßen sichtbar war, stammte aus dem Fettgewebe, wie Auftragungen von Waschpuffer ohne β -LPH zeigten. In der SDS-Gelelektrophorese besaß sie ein Molekulargewicht von $65\,000 \pm 5\,000$ (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus 6 Bestimmungen).

Durch Scannen der ungefärbten Polyacrylamidgelstreifen

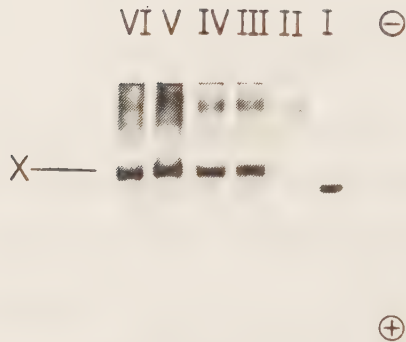


Abbildung 15: Analyse des wässrigen Unterstandes nach Inkubation von B-LPH (10 nmol) mit 600 mg intaktem Fettgewebe oder Fettgewebshomogenat von Kaninchen mit der Polyacrylamidgelelektrophorese pH 8,9. Die Proben wurden ohne Entsalzung aufgegeben.

I = Rinderserum-Albumin Fraktion V

II = B-LPH in Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer pH 7,4

III = Inkubation mit intaktem Fettgewebe über 5 min,

IV = über 30 min, V = Inkubation mit Fettgewebshomo-

genat über 5 min, VI = über 30 min

X = Aus dem Fettgewebe stammende Bande (MG 65 000 $\pm$ 5 000)

bei 280 nm konnte eine zeitabhängige Degradation gezeigt werden. Nach 15 min Inkubation waren von 10 nmol eingesetztem B-LPH 3,85 nmol degradiert, nach 30 min 4,88 nmol und nach 45 min 6,08 nmol. Diese Werte wurden durch Bestimmung der Peakfläche wie unter B.7. für die HPLC beschrieben, erhalten. Eine Auswertung ist jedoch bei diesen Bedingungen fragwürdig, insbesondere fallen die

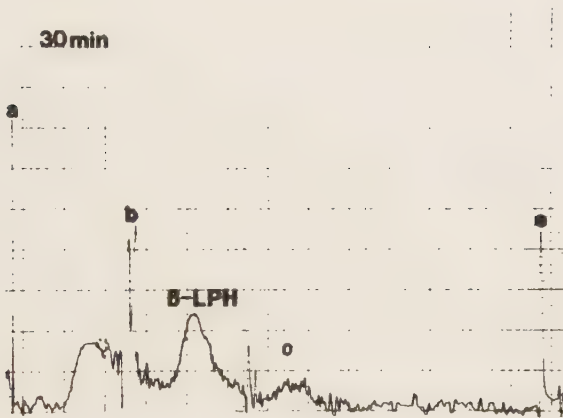


Abbildung 16: Degradation von B-LPH (30 nmol) im intakten Fettgewebe des Kaninchens (500 mg) nach 30 min. Analyse mit der Polyacrylamidgelelektrophorese. Scannen des ungefärbten Geles bei 280 nm. a = Gelanfang, b = Auftragungsort, e = Gelende. Nach dem B-LPH-Peak (o) der neu aufgetretene Peptidpeak.

starken Schwankungen der Nulllinie, hervorgerufen durch Unreinheiten im Gel bei der erforderlichen hohen Empfindlichkeit auf (Abbildung 16). Somit mußte für diese geringen Peptidmengen eine sensitivere Methode angewandt werden.

1.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

In Abbildung 17 ist der Leerwert dargestellt: 16,7 nmol B-LPH in 100 µl Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer. Das zu diesen Inkubationsversuchen verwendete B-LPH ist nicht



Abbildung 17: HPLC-Analyse des Leerwertes (16,7 nmoI β -LPH in 100 μ l Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer ohne Fettgewebe). A = Auftragszeit, E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

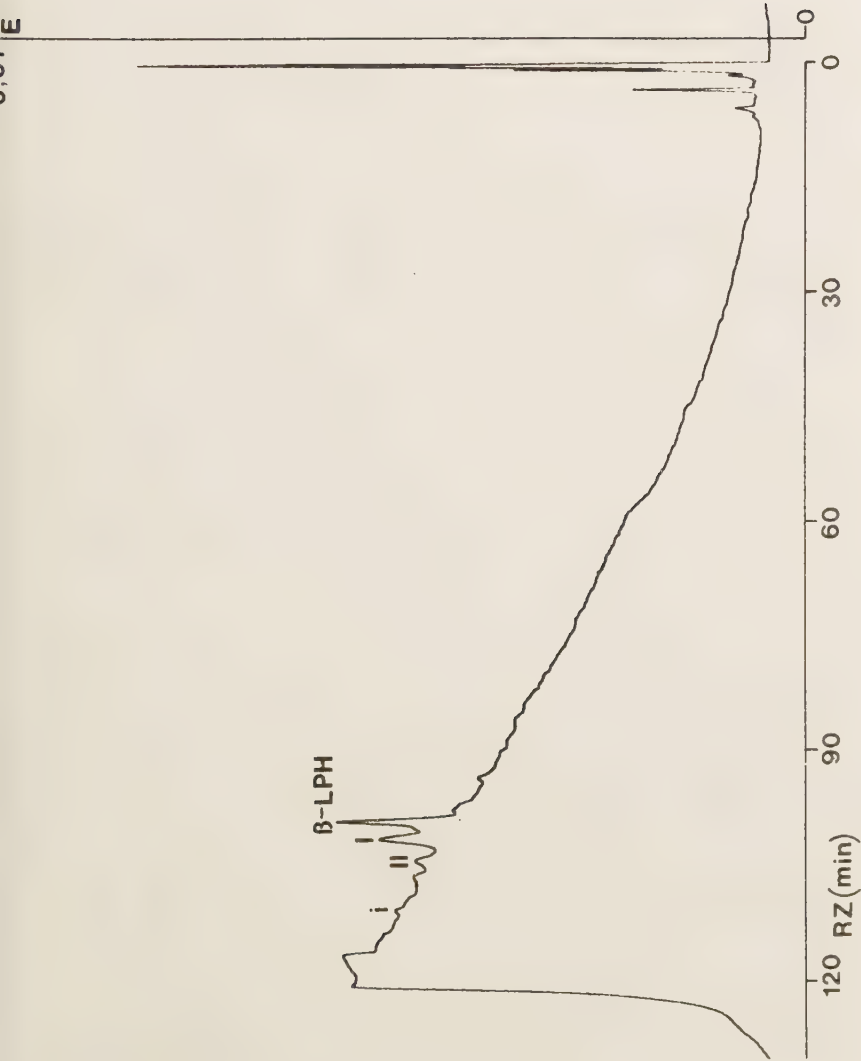


Abbildung 18: HPLC-Analyse des wässrigen Unterstandes nach 30-minütiger Inkubation von β -LPH (10 nmol) mit 400 mg intaktem Fettgewebe des Kaninchens. I, II = Neuaufgetretene Peaks, die zur weiteren Analyse gesammelt wurden, E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

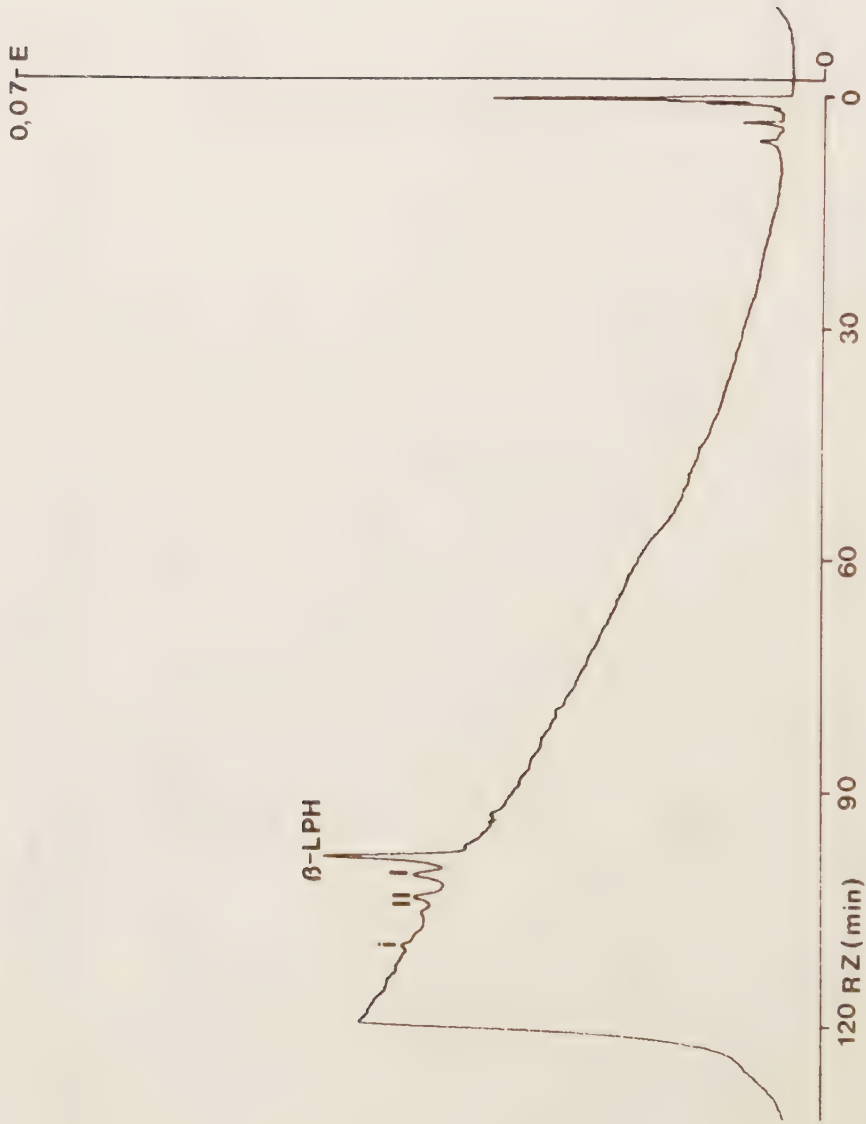


Abbildung 19: HPLC-Analyse des wässrigen Unterstandes nach 30-minütiger Inkubation von β -LPH (10 nmol) mit 400 mg Fettgewebshomogenat des Kaninchens. I, II = Neuaufgetretene Peaks, die zur weiteren Analyse gesammelt wurden, E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

über die HPLC, sondern nur über die Säulenchromatographie gereinigt. Somit sieht man kleine Schulterpeaks. Außer dem B-LPH sieht man den Auftragungspeak und Verunreinigungen der mobilen Phase. Abbildung 18 zeigt eine Analyse einer Inkubation mit intaktem Fettgewebe, Abbildung 19 die Inkubation von B-LPH mit Fettgewebshomogenat über 30 min. Der B-LPH-Peak ist gegenüber dem Leerwert deutlich vermindert, und es entstehen zwei neue Peaks (I und II). Die Peaks am Anfang des Laufes sind auch vorhanden, wenn Inkubationspuffer nach Abtrennung vom Fettgewebe ohne B-LPH aufgetragen wird und stammen aus dem Fettgewebe. Unter anderem handelt es sich auch um Adenosin, das während der Inkubation freigesetzt wird (Turpin et al. 1977). Adenosin konnte durch Beginn des Gradienten bei 100 % Puffer A als alleiniger Peak dargestellt werden und war bis zu einer Konzentration von 0,1 nmol detektierbar.

Weiter wurde versucht, das bei der Inkubation freigesetzte Glycerin nachzuweisen: es konnte bei der benutzten Wellenlänge von 225 nm nicht detektiert werden. Von den freien Fettsäuren wurden Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und Linolensäure untersucht. Sie eluierten bei Retentionszeiten zwischen 130 und 150 min auf der Aquapore RP 300 Säule, somit nach den Retentionszeiten der Peptide.

Die Retentionszeiten der beiden neu aufgetretenen Peaks

entsprachen keiner der bekannten Proopiomelanocorticotropinpeptiden (s. Abbildung 7, B.5.2.b).

2. Einfluß von verschiedenen Collagenasen

Begonnen wurde mit Untersuchungen zur Degradation von B-LPH an Adipocyten, die mit Hilfe von Collagenase isoliert wurden. Dabei ließen sich zunächst keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen, insbesondere konnte in den Inkubationsproben auch bei höheren Mengen von eingesetztem B-LPH und kurzen Inkubationszeiten kein B-LPH mehr nachgewiesen werden.

Deshalb wurde unter dem Verdacht, daß unspezifische Proteasen der Collagenasepräparationen B-LPH degradieren, Inkubationsversuche mit B-LPH und verschiedenen Collagenasen durchgeführt: Collagenase CLS I und CLS II der Fa. Worthington und hochgereinigte Collagenase der Fa. Calbiochem (s. B.2.1.a), Collagenaseaktivität 150 U/ml, Collagenaseverdünnungen von 1:1 bis 1:10⁷ in Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer pH 7,4, 3 - 5 nmol Peptid, Inkubationszeiten 1 min, 5 min und 30 min.

Die Inkubation von B-LPH zusammen mit den Collagenasepräparationen CLS I und CLS II in Konzentrationen, die gewöhnlich zu Fettzellpräparationen eingesetzt werden, führte innerhalb einer Minute zu einer völligen Zerstörung dieser Peptide, jedenfalls konnte kein ent-

sprechender Peptidpeak mehr auf dem HPLC-Chromatogramm gefunden werden. Dieses Peptid wurde auch von Verdünnungen der Stammlösungen dieser beiden Collagenasepräparationen bis herab zu $1:10^6$ völlig degradiert ($n = 3$).

Um zu untersuchen, ob die Proteasen, die für die rasche und unspezifische Degradation von Peptiden verantwortlich sind, durch wiederholtes und ausgedehntes Waschen aus den Fettzellpräparationen entfernt werden konnten (s. B.2.1.b), wurde B-LPH mit dem dritten Waschpuffer der Adipocyten und mit den Adipocyten selbst inkubiert. Wie die Abbildungen 19, 20, 21 und 22 zeigen, wurde B-LPH durch den Waschpuffer und die gewaschenen Adipocyten innerhalb von einer Minute vollständig und unspezifisch degradiert ($n = 3$).

Im Gegensatz dazu baute hochgereinigte Collagenase B-LPH nicht mehr in Verdünnungen ab, die niedriger als $1:1000$ waren ($n = 3$). Diese relativ geringen Kontaminationen durch unspezifische Proteasen konnten offensichtlich durch die Waschprozedur entfernt werden, da sowohl der dritte Waschpuffer als auch die mit hochgereinigter Collagenase präparierten Zellen nur zu einer geringen Degradation von B-LPH führten (Abbildung 23 und 24).

Die Kontrolluntersuchungen mit intaktem Fettgewebe und mit Waschpuffer von intaktem Fettgewebe zeigten eben-

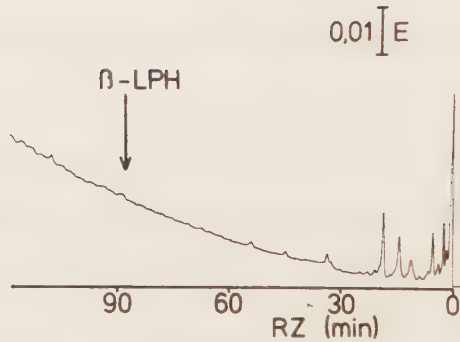


Abbildung 19: Vollständiger Abbau von β -LPH (10 nmol) innerhalb 1 min durch 1 ml des dritten Waschpuffers von mit Collagenase CLS I behandelten Adipocyten. Analyse mit HPLC. E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

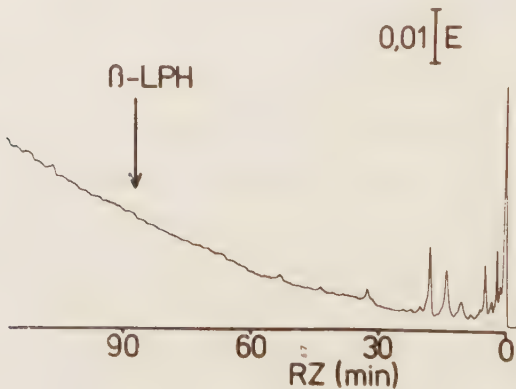


Abbildung 20: Vollständiger Abbau von β -LPH (10 nmol) innerhalb 1 min durch 1 ml des dritten Waschpuffers von mit Collagenase CLS II präparierten Adipocyten. Analyse mit HPLC. E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

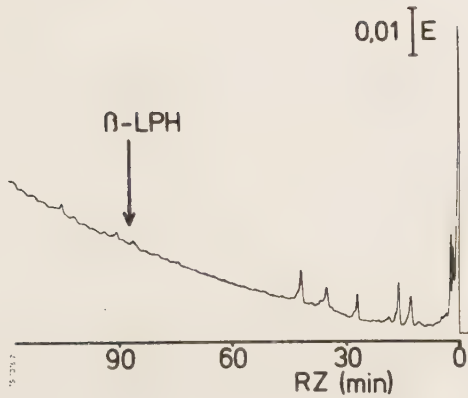


Abbildung 21: Vollständiger Abbau von B-LPH (10 nmol) durch 70 000 mit Hilfe von Collagenase CLS I präparierten Adipocyten in 1 min. Analyse mit HPLC. E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

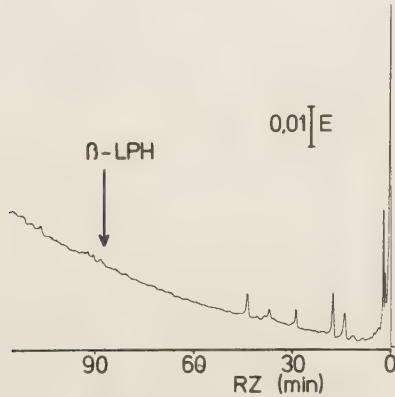


Abbildung 22: Vollständiger Abbau von B-LPH (10 nmol) durch 70 000 mit Hilfe von Collagenase CLS II präparierten Adipocyten in 1 min. Analyse mit HPLC. E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

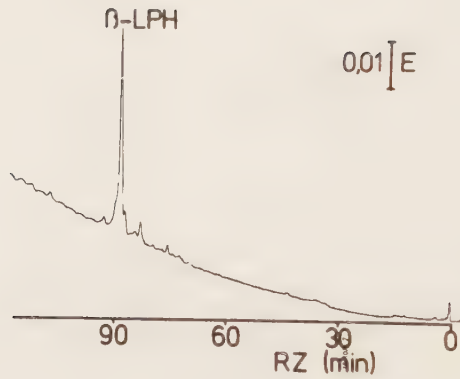


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm nach Inkubation von β -LPH (10 nmol) mit 1 ml des dritten Waschpuffers von Adipocyten, die mit hochgereinigter Collagenase präpariert wurden (1 min). E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

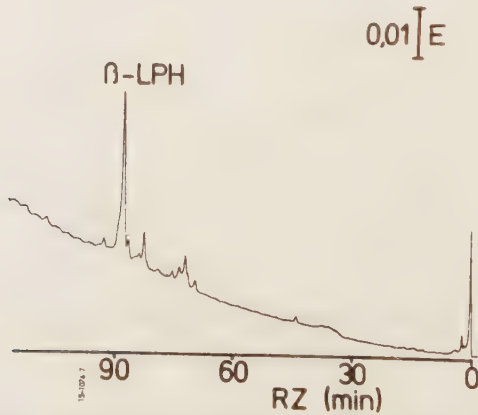


Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm nach Inkubation über 1 min von β -LPH (10 nmol) mit 70 000 Adipocyten, die mit hochgereinigter Collagenase präpariert wurden. E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

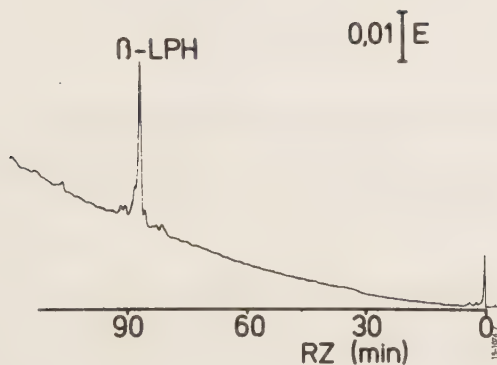


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm nach Inkubation von β -LPH (10 nmol) über 1 min mit 1 ml des dritten Waschpuffers von intaktem Fettgewebe. E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

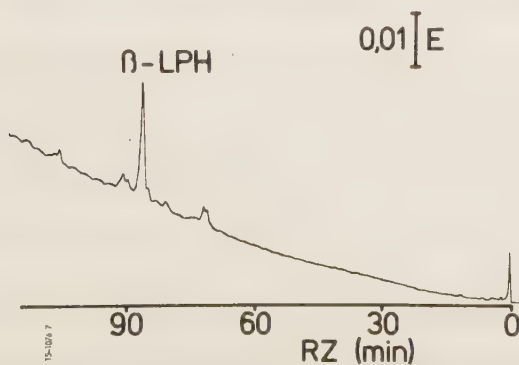


Abbildung 26: HPLC-Chromatogramm nach Inkubation von β -LPH (10 nmol) über 1 min mit 300 mg intaktem Fettgewebe. E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

falls nur eine geringe Degradation von β -LPH, die offensichtlich auf Proteasen, die aus dem Fettgewebe freigesetzt wurden zurückgeführt werden kann (Abbildung 25 und 26).

Die Zugabe von Rinderserum-Albumin Fraktion V bis zu einer Konzentration von 4 % führte zu keiner Hemmung der unspezifischen Degradation von β -LPH.

Zusammenfassend wird somit festgestellt, daß die unspezifische proteolytische Aktivität der beiden Collagenasepräparationen CLS I und CLS II trotz intensiven Waschens nicht aus der Zellpräparation entfernt werden konnte, wie durch die schnelle und vollständige Degradation von β -LPH durch die entsprechenden Adipocytenpräparationen gezeigt wurde. Gleichzeitig mit dem vollständigen Verschwinden des β -LPH-Peaks traten mehrere kleine neuen Peaks auf, deren Retentionszeiten nicht mit der jener Peaks übereinstimmten, die nach Inkubation mit intaktem Fettgewebe entstanden. Die Abbauprodukte von β -LPH nach Inkubation mit den CLS I und II behandelten Zellen und den entsprechenden Waschpuffern zeigen ein unterschiedliches Bild.

Die geringe unspezifische Aktivität der hochgereinigten Collagenase konnte durch die Waschprozedur fast vollständig entfernt werden. Keiner der neu aufgetretenen Peaks hatte eine identische Retentionszeit mit jenen Peaks, die nach Inkubation von Collagenase CLS I und CLS II behandelten Adipocyten auftraten. Das Muster der Degradation war vielmehr vergleichbar mit dem, das nach Inkubation von

B-LPH mit intaktem Fettgewebe festzustellen war.

Wegen dieser unspezifischen Degradation bei Fettzellpräparationen, die selbst bei Anwendung von hochgereinigter Collagenase auftrat, wurden die weiteren Untersuchungen zur Proteolyse von B-LPH im Fettgewebe des Kaninchens hauptsächlich an intaktem Fettgewebe oder Fettgewebshomogenat durchgeführt.

3. Einfluß der Trennverfahren nach Inkubationsende auf die Degradation

Bei dem Versuch, eine Zeitabhängigkeit der Degradation nachzuweisen, bestand das Problem darin, einen zuverlässigen Reaktionsstop bei kurzen Inkubationszeiten zu erreichen. Deshalb wurden verschiedene Methoden zur Beendigung der Degradation versucht (s. B.4.).

3.1. Zentrifugation durch Filtrationsmembranen

Die verwendeten Membranen (Centriflo CF 25 Kegel) waren durchlässig bis zu einem Molekulargewicht von 25 000, somit für B-LPH (9 200) und seine Degradationsprodukte. Allerdings wurden sie rasch und in unterschiedlicher Weise durch zurückzuhaltende Fettzellen und Zelldetritus verstopft, sodaß die erhaltene Filtratmenge bei identischer Verfahrensweise unterschiedlich ausfiel. Dieses wurde u.a. bei der Lyophilisation (unterschiedliche Lyophilisatmenge) sichtbar, wie auch bei der Elektrophorese mit unterschied-

lich starker Bandenfärbung bei identisch behandelten Proben. Die Membranen konnten nur einmalig verwendet werden, da trotz intensiven Wässerns und Reinigungsversuchen die Poren größtenteils verlegt waren.

3.2. Absaugen über Filterpapier mit Vielfachfiltrationsgerät

Der Vorteil dieses Systems bestand in den billigeren Filterpapieren und der Möglichkeit 12 Proben gleichzeitig gewinnen zu können. Grundsätzlich entstanden jedoch genauso unreproduzierbare Ergebnisse wie oben, da ebenfalls die Filterporen durch Fettgewebe zugesetzt wurden. Hinzu kam, daß diese Filterpapiere vorher 1 h lang gewässert werden mußten. Dadurch war entweder eine nicht bestimmbare Aqua dest. aus dem Filterpapier im Filtrat enthalten, oder es ging bei vorheriger Trocknung der Filter eine nicht bestimmbare Menge Inkubationsmedium im Filter verloren. Nicht zu unterschätzen war dabei eine Erwärmung der Proben auf Raumtemperatur während des Filtriervorganges und somit eine weitere Degradation von noch nicht von dem Fettzellmedium abgetrenntem B-LPH.

3.3. Zentrifugation und Absaugen des Unterstandes

Durch kurzes Kühlen in Eis wurde erreicht, daß die Degradation beendet wurde. Durch die Zentrifugation bildete sich ein Überstand von intaktem Fettgewebe, Zellen oder Fettgewebshomogenat, der durch erneutes Kühlen in eiskaltem Wasser erstarrte. Zunächst konnte somit eine gute Trennung erreicht werden. Unreinheiten und Ver-

änderungen der Ergebnisse entstanden jedoch beim Absaugen des Unterstandes, da der erstarrte Überstand bei dem Entfernen oder Durchstoßen mit der Pipettenspitze bröckelig zerfiel und beim Absaugen des wässrigen Unterstandes eine erneute Durchmischung auftreten konnte. Dies wurde durch die Bildung eines neuen Überstandes bei wiederholter Zentrifugation nachgewiesen.

3.4. Zusatz von Orthophosphorsäure

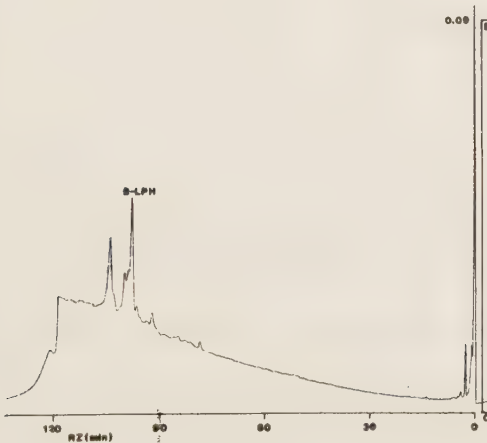


Abbildung 27: HPLC-Chromatogramm der Inkubation von B-LPH (10 nmol) mit 500 mg Fettgewebshomogenat über 30 min und Zugabe von 46 μ mol Orthophosphorsäure zur Reaktionsbeendigung. E = Extinktion, RZ = Retentionszeit.

Durch Ansäuern der entnommenen Aliquots konnte zwar ein zuverlässiger Stop der Degradation erreicht werden, do-

kumentiert durch die zeitabhängige Abnahme des β -LPH-Peaks. Es traten jedoch bereits im Leerwert bei der Zugabe von 46 μmol Orthophosphorsäure zusätzliche kleine Peaks und ein Schulterpeak am β -LPH auf als Hinweis auf mögliche Änderungen in der Sekundär- und / oder Tertiärstruktur des Moleküls durch starkes Ansäuern. Abbildung 27 zeigt bei Inkubation von β -LPH mit Fettgewebshomogenat nach 30 min die Zunahme von kleinen Peaks mit kürzerer Retentionszeit und den Schulterpeak als Ausdruck einer unspezifischen Degradation.

3.5. Zusatz von Trennöl

Durch Zugabe eines semisynthetischen Trennöls wie Dinonylphthalat nach dem Reaktionsende wurde nach Zentrifugation eine hervorragende Trennung erreicht, da sich das Öl zwischen Über- und wässrigem Unterstand einstellte und beim Absaugen des Unterstandes durch Durchstechen des Kunststoffgefäßes unterhalb des Trennöls eine Verwirbelung des Überstandes mit erneuter Durchmischung mit dem Puffer vermieden werden konnte. Das Trennöl war darüberhinaus so zähflüssig, daß es nach vollständiger Entfernung des wässrigen Unterstandes die verwendete Kanüle mit 0,7 mm Außendurchmesser verstopfte.

Zusammenfassend wird festgestellt, daß trotz rasch einsetzender Proteolyse mit kurzen Inkubationszeiten ein

zuverlässiger und rascher Reaktionsstop erreicht werden muß. Dazu eignet sich am besten das sofortige Abkühlen der Proben in Eis, das bei dem vorliegenden geringen Aliquotvolumen kein Problem ist, danach die Zentrifugation durch ein semisynthetisches Öl. Eine Interaktion zwischen dem Dinonylphthalat und β -LPH oder dem Fettgewebe wurde durch Inkubation mit und ohne dem semisynthetischem Öl ausgeschlossen. Als weitere Vorteile dieser Vorgehensweise wird ein erneutes Durchmischen der Proben bei Absaugen des wässrigen Unterstandes verhindert, der Verlust an Probenflüssigkeit läßt sich minimalisieren, das zähflüssige Öl verstopfte die verwendete Kanüle. Wenn tatsächlich geringe Mengen von Dinonylphthalat in die zu analysierenden Proben gelangte, so erschien es mit einer kurzen Retentionszeit (7 min) am Anfang des Gradienten und störte die Analyse auf der HPLC nicht.

4. Zeitabhängigkeit der Degradation von β -LPH

Die Ergebnisse eines Versuches mit dem Fettgewebe eines Tieres in Abbildung 28 zeigen die Zeitabhängigkeit des Abbaus von β -LPH durch intaktes Fettgewebe und Fettgewebshomogenat. Nach 30 Sekunden zeigte sich bereits eine Verminderung des β -LPH-Peaks um 10 %. Bis 30 Minuten erfolgte eine kontinuierliche weitere Proteolyse, die durch Abnahme des β -LPH-Peaks nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Inkubation von β -LPH ohne Fettgewebe nach 30 Minuten keine Verminderung des Peptidhormonpeaks, es fand keine Degradation statt.

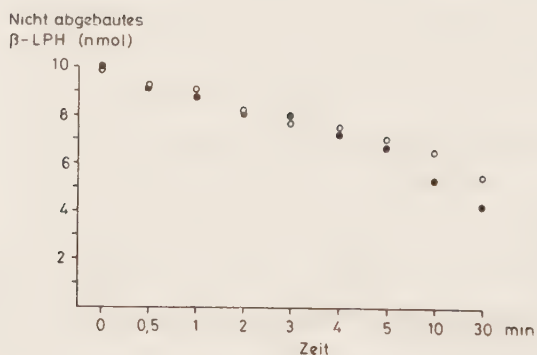


Abbildung 28: Zeitabhängiger Abbau von β -LPH durch intaktes Fettgewebe (o) und Fettgewebshomogenat (●). Pro Ansatz wurden 600 mg Fettgewebe verwendet. Analyse des Abbaus mit HPLC.

Fettgewebshomogenat baute β -LPH stärker ab als die gleiche Menge intaktes Fettgewebe. Die Gewichtsangabe für das Fettgewebshomogenat bedeutet das Gewicht der eingesetzten Fettgewebstückchen vor Homogenisierung. Wie jedoch die Auswertung der Degradation durch Fettgewebe von 23 Tieren zeigt (Abbildung 29), war der stärkere Abbau durch Fettgewebshomogenat bei 30 Minuten Inkubationszeit nicht signifikant unterschiedlich zu dem durch intaktes Fettgewebe.

Auch die Inkubation von mit hochgereinigter Collagenase präparierten Adipocyten zeigte eine zeitabhängige Degradation von β -LPH (Abbildung 32).

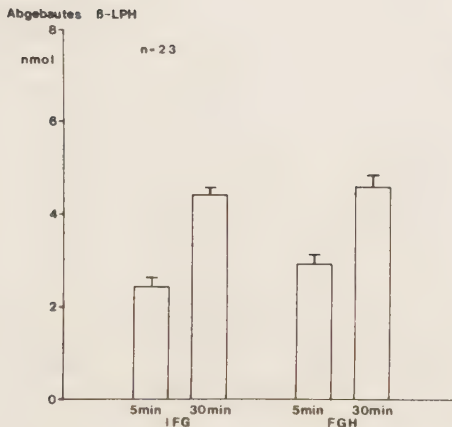


Abbildung 29: Zusammenstellung der Degradation von β -LPH durch intaktes Fettgewebe (IFG) und Fettgewebshomogenat (FGH) bei 23 Tieren. Mittelwert $\pm$ SEM. Differenz bei 30 Minuten statistisch nicht signifikant. Wilcoxon Test für Paardifferenzen. Analyse des Abbaus mit HPLC.

5. Abbau von β -LPH mit verschiedenen Mengen Fettgewebe

Abbildung 30 zeigt ein repräsentatives Beispiel eines Versuches der Inkubation von β -LPH mit verschiedenen Mengen von intaktem Fettgewebe, Abbildung 31 mit verschiedenen Mengen von Fettgewebshomogenat. Sowohl nach 5 Minuten wie auch nach 30 Minuten war die Stärke des Abbaus von der jeweils eingesetzten Fettgewebsmenge abhängig. Die Inkubation mit Adipocyten (mit hochgereinigter Collagenase präpariert) zeigte ebenfalls eine Mengenabhängigkeit. Bei 500 000 Adipocyten wurde das eingesetzte β -LPH bereits innerhalb von 5 Minuten vollständig abgebaut (Abbildung 32).

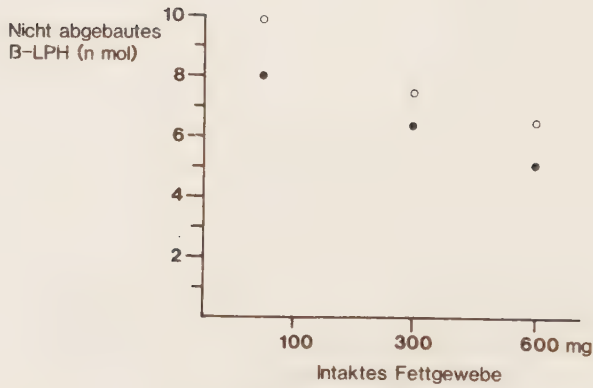


Abbildung 30: Abbau von β -LPH durch verschiedene Mengen von intaktem Fettgewebe des Kaninchens. Analyse des Abbaus mit HPLC. o Inkubationszeit 5 min, ● Inkubationszeit 30 min.

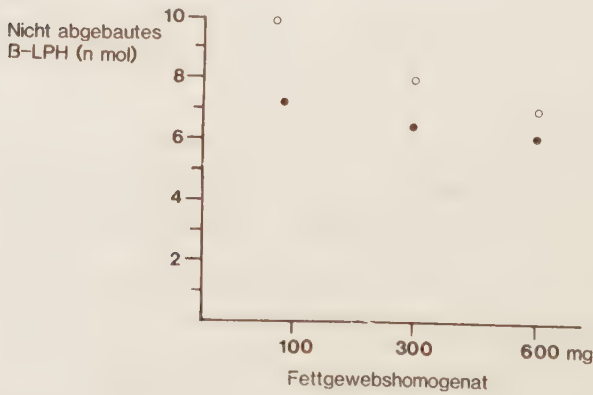


Abbildung 31: Abbau von β -LPH durch verschiedene Mengen von Fettgewebshomogenat. Analyse des Abbaus mit HPLC. o Inkubationszeit 5 min, ● Inkubationszeit 30 min.

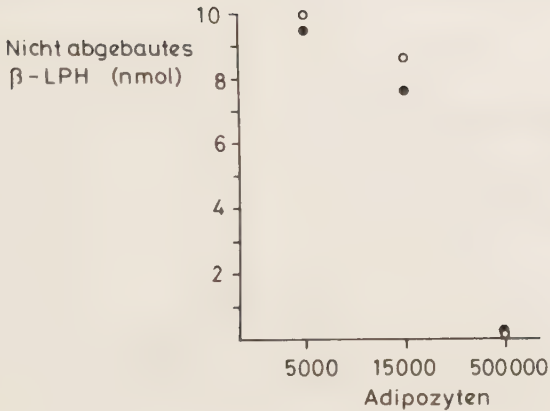


Abbildung 32: Abbau von β -LPH durch verschiedene Mengen von mit hochgereinigter Collagenase präparierten Adipozyten. Analyse des Abbaus mit HPLC. o Inkubationszeit 5 min, ● Inkubationszeit 30 min.

6. Abbau von β -LPH bei verschiedenem pH

Die Proteolyse von β -LPH im Fettgewebe ist vom pH-Wert im Inkubationsmedium abhängig ($n = 3$) (Abbildung 33). Der pH-Wert wurde vor und nach Zugabe von Fettgewebe oder Fettgewebshomogenat eingestellt, da nach Zugabe von Fettgewebe der pH im Inkubationsmedium rasch absinkt, nach 5 Minuten bei einigen Proben bereits auf 7,20.

Bei einem pH-Wert von 11,0 war nahezu kein Abbau von β -LPH nachweisbar. Beim Abbau von intaktem Fettgewebe zeigte sich ein relatives Maximum bei pH 5,0, im Fett-

gewebshomogenat bei pH 3,0.

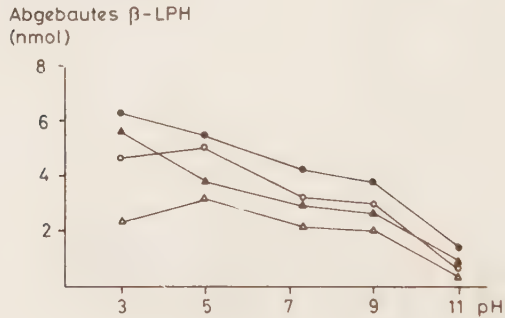


Abbildung 33: Abbau von B-LPH durch intaktes Fettgewebe und Fettgewebshomogenat bei unterschiedlichen pH-Werten. Einstellung des pH-Wertes vor und nach Zugabe des Fettgewebes. Analyse des Abbaus mit HPLC. Ergebnisse von 2 gleichaltrigen Kaninchen:

- 4,8 kg schwer, △ 3,7 kg schwer
- △ Intaktes Fettgewebe (400 mg)
- ▲ Fettgewebshomogenat (400 mg)

7. Abbau von B-LPH durch Fettgewebe von Kaninchen unter verschiedenen Ernährungszuständen

An 6 Paaren von etwa gleichschweren und gleichaltrigen weiblichen Kaninchen wurde das Ausmaß der Degradation von B-LPH im Fettgewebe in Abhängigkeit vom Ernährungszustand untersucht. An einem Versuchstag wurde jeweils ein ad libitum gefüttertes und ein 72 h nüchtern gesetztes Tier miteinander verglichen. Das nüchterne Tier

konnte Wasser in beliebiger Trinkmenge zu sich nehmen.

Intaktes Fettgewebe und Fettgewebshomogenat von ad libitum gefütterten Kaninchen degradierten signifikant mehr ($p \leq 0,05$) B-LPH als intaktes Fettgewebe und Fettgewebshomogenat von 72 h nüchtern gesetzten Tieren (Abbildung 34).

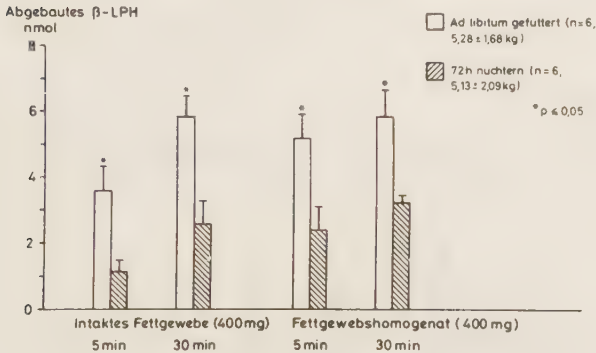


Abbildung 34: Unterschiedlicher Abbau von B-LPH durch intaktes Fettgewebe und Fettgewebshomogenat von ad libitum gefütterten und 72 h nüchtern gesetzten Kaninchen. Analyse des Abbaus mit HPLC. Mittelwert $\pm$ SEM. Wilcoxon Test für Paardifferenzen.

8. Abbau von β -LPH durch Fettgewebe von gleichaltrigen Kaninchen mit unterschiedlichem Körpergewicht

6 Paare von gleichaltrigen weiblichen Kaninchen, die jedoch unterschiedliches Körpergewicht und Fettzellgröße hatten, wurden bezüglich Unterschiede in der Degradation von β -LPH miteinander verglichen. Es waren weiße Neuseeländer, die Paare stammten jeweils aus dem gleichen Wurf. Sie waren ad libitum gefüttert.

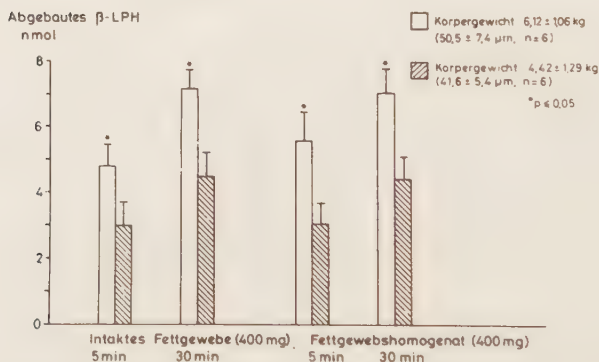


Abbildung 35: Unterschiedlicher Abbau von β -LPH durch intaktes Fettgewebe und Fettgewebshomogenat von gleichaltrigen Kaninchen mit unterschiedlichem Körpergewicht. Analyse des Abbaus mit HPLC. Mittelwert $\pm$ SEM. Wilcoxon Test für Paardifferenzen.

Intaktes Fettgewebe und Fettgewebshomogenat der Gruppe von Kaninchen mit höherem Körpergewicht und größeren Fettzellen degradierten signifikant mehr ($p \leq 0,05$) β -LPH als Fettgewebe und Fettgewebshomogenat von Tieren

mit niedrigerem Körpergewicht und kleineren Fettzellen (Abbildung 35). Bei gleichschweren Tieren unterschiedlicher Rasse oder unterschiedlichen Alters konnte kein signifikant unterschiedlicher Abbau gefunden werden.

Zusammenfassend war sowohl bei Tieren mit unterschiedlichem Gewicht als auch mit unterschiedlichem Ernährungszustand die Degradation von β -LPH im intakten und im homogenisierten Fettgewebe unterschiedlich. Schwerere Tiere und ad libitum gefütterte Tiere bauten mehr β -LPH als leichtere und nüchtern gesetzte Tiere ab.

9. Hemmung des Abbaus von β -LPH im Fettgewebe durch Insulin

Diese Untersuchungen wurden an 7 ad libitum gefütterten Kaninchen durchgeführt. Insulin war in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l in der Lage, die Degradation von β -LPH sowohl durch intaktes Fettgewebe als auch durch Fettgewebshomogenat signifikant ($p \leq 0,05$) zu inhibieren (Abbildung 36).

Im Fettgewebshomogenat konnte eine Hemmung noch bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/l Insulin gefunden werden, während gleiche oder niedrigere Insulinkonzentrationen bei intaktem Fettgewebe unwirksam waren. Bei einer Insulinkonzentration von 10^{-8} mol/l fand keine Hemmung der Degradation von β -LPH im intakten Fettgewebe und im Fettgewebshomogenat mehr statt.

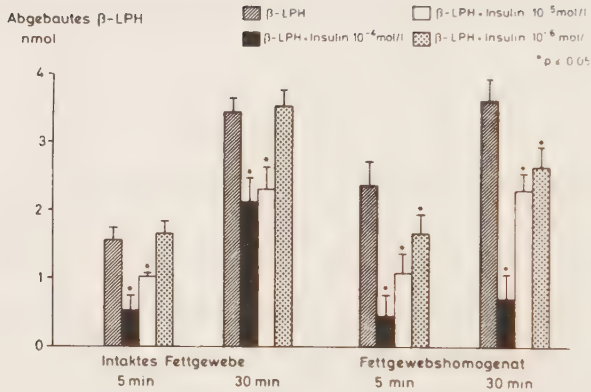


Abbildung 36: Hemmung des Abbaus von β -LPH an intaktem Fettgewebe und Fettgewebshomogenat durch Insulin ($n = 7$). Analyse des Abbaus mit HPLC. Mittelwert $\pm$ SEM. Wilcoxon Test für Paardifferenzen.

10. Beeinflussung des Abbaus von β -LPH durch Proteasen-inhibitoren

Die Untersuchungen der Beeinflussung der Proteolyse von β -LPH durch Enzymhemmer wurden am Fettgewebe von adultum gefütterten weißen Neuseeländern durchgeführt, wobei jeder Proteaseinhibitor am Fettgewebe von 3 verschiedenen Tieren eingesetzt wurde. Das in Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer gegebene Fettgewebe oder Fettgewebshomogenat wurde jeweils 15 Minuten mit dem Proteaseinhibitor vorinkubiert, danach wurde β -LPH in die Proben pipettiert.

Leupeptin (Tabelle 5) und Antipain (Tabelle 6) konnten in einer Konzentration von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l den Abbau von B-LPH durch intaktes Fettgewebe oder Fettgewebshomogenat nicht hemmen. Ebensowenig inhibierte Pepstatin A (Tabelle 7) die Degradation von B-LPH.

Dagegen konnte Chymostatin (Tabelle 8) in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l den Abbau sowohl im intakten Fettgewebe als auch im Fettgewebshomogenat hemmen. Auch inhibierte Aprotinin (Tabelle 9) bei $5 \cdot 10^{-2}$ und $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l die Proteolyse von B-LPH, niedrigere Konzentrationen waren wirkungslos.

Bacitracin (Tabelle 10) hatte keinen Effekt auf den Abbau von B-LPH.

Die lysosomotropen Substanzen Chloroquin (Tabelle 11) und Ammoniumchlorid (Tabelle 12) inhibierten den Abbau in einer Konzentration von 10^{-2} und 10^{-3} mol/l.

Der Metallchelator Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Tabelle 13) konnte ebenfalls in einer Konzentration von 10^{-2} und 10^{-3} mol/l den Abbau dieses Peptidhormons an intaktem Fettgewebe und an Fettgewebshomogenat hemmen.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch Leupeptin (n = 3)

	Degradation ohne Leupeptin	Degradation in Anwesenheit von Leupeptin	
		10^{-4} mol/l	10^{-5} mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	5,10 $\pm$ 3,21	5,83 $\pm$ 1,56	5,53 $\pm$ 0,62
Intaktes Fett- gewebe 30 min	4,21 $\pm$ 2,43	4,41 $\pm$ 1,09	4,40 $\pm$ 0,56
Fettgewebshomo- genat 5 min	4,52 $\pm$ 3,30	4,32 $\pm$ 0,67	4,36 $\pm$ 0,73
Fettgewebshomo- genat 30 min	4,03 $\pm$ 3,21	4,39 $\pm$ 2,08	3,80 $\pm$ 1,98

Tabelle 5: Nicht degradiertes β -LPH in nmol. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit der HPLC.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch Antipain (n = 3)

	Degradation ohne Antipain	Degradation in Anwesenheit von Antipain 10^{-4} mol/l	10^{-5} mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	8,30 $\pm$ 1,15	8,78 $\pm$ 0,64	8,02 $\pm$ 1,76
Intaktes Fett- gewebe 30 min	5,99 $\pm$ 0,67	6,89 $\pm$ 0,32	5,93 $\pm$ 0,78
Fettgewebshomo- genat 5 min	8,00 $\pm$ 0,26	8,41 $\pm$ 0,51	8,11 $\pm$ 0,56
Fettgewebshomo- genat 30 min	6,33 $\pm$ 1,02	6,95 $\pm$ 1,72	6,12 $\pm$ 1,76

Tabelle 6: Nicht degradiertes β -LPH in nmol. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit der HPLC.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch Pepstatin A (n = 3)

	Degradation ohne Pepstatin A	Degradation in Anwesenheit von Pepstatin A 10^{-5} mol/l	10^{-6} mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	8,03 $\pm$ 0,61	7,85 $\pm$ 0,24	7,79 $\pm$ 1,13
Intaktes Fett- gewebe 30 min	6,40 $\pm$ 0,95	5,88 $\pm$ 1,03	6,38 $\pm$ 1,15
Fettgewebshomo- genat 5 min	7,76 $\pm$ 1,22	7,05 $\pm$ 1,39	5,83 $\pm$ 1,34
Fettgewebshomo- genat 30 min	6,06 $\pm$ 2,49	5,45 $\pm$ 0,98	3,97 $\pm$ 0,68

Tabelle 7: Nicht degradiertes β -LPH in nmol. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit der HPLC.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch Chymostatin ($n = 3$)

	Degradation ohne Chymostatin	Degradation in Anwesenheit von Chymostatin 10^{-4} mol/l	10^{-5} mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	$6,73 \pm 3,25$	$8,73 \pm 2,37$	$8,58 \pm 2,47$
Intaktes Fett- gewebe 30 min	$4,67 \pm 1,81$	$6,91 \pm 1,04$	$6,32 \pm 0,24$
Fettgewebshomo- genat 5 min	$6,50 \pm 3,10$	$5,75 \pm 3,06$	$7,45 \pm 1,13$
Fettgewebshomo- genat 30 min	$4,96 \pm 2,96$	$6,52 \pm 0,74$	$6,61 \pm 0,50$

Tabelle 8: Nicht degradiertes β -LPH in nmol. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit HPLC.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch Aprotinin (n = 2)

	Degradation ohne Aprotinin	Degradation in Anwesenheit von Aprotinin $5 \cdot 10^{-2}$ mol/l	$5 \cdot 10^{-3}$ mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	7,45 $\pm$ 2,19	8,54 $\pm$ 2,19	8,01 $\pm$ 1,78
Intaktes Fett- gewebe 30 min	4,65 $\pm$ 2,85	7,94 $\pm$ 1,87	7,03 $\pm$ 1,63
Fettgewebshomo- genat 5 min	7,25 $\pm$ 3,32	8,81 $\pm$ 1,16	7,45 $\pm$ 0,87
Fettgewebshomo- genat 30 min	4,20 $\pm$ 1,97	8,75 $\pm$ 0,12	8,16 $\pm$ 0,34

Tabelle 9: Nicht degradiertes β -LPH in nmol. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit der HPLC.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch Bacitracin (n = 3)

	Degradation ohne Bacitracin	Degradation in Anwesenheit von Bacitracin 10^{-4} mol/l	10^{-5} mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	7,74 $\pm$ 0,85	7,24 $\pm$ 2,35	7,52 $\pm$ 1,96
Intaktes Fett- gewebe 30 min	5,90 $\pm$ 0,72	6,87 $\pm$ 2,68	5,82 $\pm$ 1,66
Fettgewebshomo- genat 5 min	7,58 $\pm$ 0,38	8,23 $\pm$ 1,04	8,88 $\pm$ 0,49
Fettgewebshomo- genat 30 min	5,64 $\pm$ 0,89	6,43 $\pm$ 2,24	6,23 $\pm$ 1,17

Tabelle 10: Nicht degradiertes β -LPH in nmol. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit der HPLC.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch Chloroquin (n = 3)

	Degradation ohne Chloroquin	Degradation in Anwesenheit von Chloroquin 10^{-2} mol/l	10^{-3} mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	$8,62 \pm 0,61$	$8,76 \pm 1,52$	$7,86 \pm 1,79$
Intaktes Fett- gewebe 30 min	$5,46 \pm 0,94$	$8,46 \pm 2,09$	$9,65 \pm 0,23$
Fettgewebshomo- genat 5 min	$8,33 \pm 1,11$	$9,10 \pm 0,34$	$7,65 \pm 1,87$
Fettgewebshomo- genat 30 min	$5,10 \pm 1,04$	$7,81 \pm 0,22$	$5,65 \pm 0,12$

Tabelle 11: Nicht degradiertes β -LPH in nmol. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit der HPLC.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch Ammoniumchlorid ($n = 3$)

	Degradation ohne Ammoniumchlorid	Degradation in Anwesenheit von Ammoniumchlorid 10^{-2} mol/l	10^{-3} mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	$7,87 \pm 0,94$	$9,84 \pm 0,65$	$8,87 \pm 1,75$
Intaktes Fett- gewebe 30 min	$5,53 \pm 0,61$	$8,75 \pm 1,13$	$6,26 \pm 1,04$
Fettgewebshomo- genat 5 min	$7,84 \pm 0,20$	$9,34 \pm 0,52$	$9,35 \pm 0,42$
Fettgewebshomo- genat 30 min	$5,79 \pm 0,20$	$9,27 \pm 2,95$	$9,12 \pm 1,78$

Tabelle 12: Nicht degradiertes β -LPH in nmo!. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit der HPLC.

Beeinflussung der Degradation von β -LPH durch EDTA (n = 3)

	Degradation ohne EDTA	Degradation in Anwesenheit von EDTA 10^{-2} mol/l	10^{-3} mol/l
Intaktes Fett- gewebe 5 min	6,13 $\pm$ 2,85	7,34 $\pm$ 1,35	6,87 $\pm$ 1,34
Intaktes Fett- gewebe 30 min	5,46 $\pm$ 2,15	8,99 $\pm$ 1,30	5,87 $\pm$ 0,25
Fettgewebshomo- genat 5 min	4,88 $\pm$ 2,70	8,13 $\pm$ 0,79	6,60 $\pm$ 0,76
Fettgewebshomo- genat 30 min	4,47 $\pm$ 2,48	7,19 $\pm$ 0,61	6,43 $\pm$ 1,45

Tabelle 13: Nicht degradiertes β -LPH in nmol. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.
Analyse mit der HPLC.

11. Molekulargewichtsbestimmung und weitere Analyse der Spaltstücke nach Inkubation von B-LPH mit Fettgewebe

Die Peptidspaltstücke Peak I und II in den Abbildungen 18 und 19, die nach Inkubation von B-LPH mit intaktem Fettgewebe und Fettgewebshomogenat neu auftraten, wurden mit Hilfe der Umkehrphasen-HPLC getrennt und gesammelt (s. B.5.2.b.2.).

Die Molekulargewichtsbestimmung mit hochauflösender Gel-permeationschromatographie (s.B.6.) ergab für Peak I und II identische Retentionszeiten wie B-LPH: Molekulargewicht $10\,200 \pm 500$ ($n = 3$).

Im Labor wurde darüberhinaus nach Lyophilisation und Entsalzung der Proben mit hochauflösender Gelpermeationschromatographie (Richter und Schwandt 1984) die Aminosäurezusammensetzung von Peak I und II analysiert. Sie zeigte die typischen Kriterien von B-LPH: Fehlen von 1/2 Cystin, Reichtum an Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Prolin und Lysin ($n = 2$). Sie unterschied sich damit nicht erheblich von der Aminosäurenanalyse des Ausgangsmaterials. Außerdem konnte für die Peaks I und II als N-terminale Aminosäure Glutaminsäure nachgewiesen werden. Diese war identisch mit der N-terminalen Aminosäure von B-LPH.

D. DISKUSSION

Das lipolytische Peptid B-Lipotropin enthält mit dem Heptapeptid 47 - 53 und dem C-terminalen B-Endorphin zwei aktive Teilsequenzen (Schwandt et al. 1981). Nachdem sowohl nur das intakte B-Lipotropin als auch eine oder beide lipolytisch aktive Sequenzen für die Fettmobilisation aus Kaninchenfettgewebe verantwortlich sein könnten, kommt der Frage nach dem Abbau von B-Lipotropin eine besondere Bedeutung zu. Um dieser Frage nachgehen zu können, waren zunächst Verfahren zu überprüfen, die eine exakte Trennung und Quantifizierung von B-Lipotropin und seinen relevanten Teilsequenzen nach Fettgewebkontakt ermöglichen.

1. Trennung von Peptidmischungen

Die zuerst durchgeführte Trennung mit der Polyacrylamidgelelektrophorese konnte nicht befriedigen. Durch den hohen Salzgehalt konnte das nach den Inkubationsversuchen erhaltene Lyophilisat nicht immer vollständig in der notwendig kleinen Menge des Probenpuffers aufgelöst werden. Es wurden wiederholt Entsalzungen mit einem Vielfachfiltrationsgerät über Membranen durchgeführt. Dabei traten jedoch hohe Peptidverluste auf, die nicht kalkulierbar waren. Deshalb wurden die erhaltenen Inkubationsproben in 200 µl - Aliquots aufgeteilt und lyophilisiert und das dann gewonnene Lyophilisat ohne Entsalzung auf das Gel aufgegeben. Dadurch gelangte nur

ein Drittel der eingesetzten Peptidmenge zur Auftragung.

Die breite Bande mit der größten Wanderungsgeschwindigkeit ist ein Peptid mit einem Molekulargewicht von $65\,000 \pm 5\,000$ in der SDS-Gelelektrophorese. Da sie sowohl bei der Inkubation von β -LPH mit intaktem Fettgewebe und Fettgewebshomogenat als auch im Waschpuffer von Fettgewebe ohne β -LPH auftrat, muß sie aus dem Fettgewebe stammen. Mit ihrem hohen Molekulargewicht und ihrer starken Konzentration führte sie wahrscheinlich über eine Veränderung der Gesamtleitfähigkeit zu einem Verschmierungeffekt (Brewer et al. 1977).

Auch durch Scannen der ungefärbten Gele bei 280 nm konnten keine reproduzierbaren quantitativen Auswertungen erhalten werden. Außerdem mußten durch Unreinheiten im Gel bei der erforderlichen hohen Empfindlichkeit des Photometers starke Schwankungen der Nulllinie hingenommen werden.

Es konnte also mit der Polyacrylamidgelelektrophorese zwar qualitativ ein Abbau von β -LPH im intakten Fettgewebe, im Fettgewebshomogenat und an mit hochgereinigter Collagenase isolierten Adipocyten des Kaninchens nachgewiesen werden, eine quantitative reproduzierbare Auswertung des Ausmaßes der Degradation unter verschiedenen Bedingungen war jedoch mit dieser Methode nicht möglich.

Zum qualitativen und auch quantitativen Nachweis von Peptiden und Proteinen setzte sich in den letzten Jahren die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) immer mehr durch. Dabei ist die Chromatographie mit Umkehrphasen (unpolare stationäre Phase und polare Elutionsmittel) das heute am häufigsten angewendete Trennsystem. Die Vorteile dieser Methode liegen in der ausgezeichneten Trennung von Peptidmischungen bis in den Nanogrammbereich hinein, wobei besonders auch Neuropeptide und ihre Kontaminationen aus Extraktionen und Flüssigkeiten identifiziert oder in hochreiner Form präparativ gewonnen werden konnten (Morris et al. 1980, Browne et al. 1982, Yuan et al. 1982, Richter und Schwandt 1983). Weitere Vorteile bestehen in der hervorragenden Reproduzierbarkeit, leichter Herstellbarkeit ausreichend reiner Eluenten, langer Stabilität der Trennsäulen und der Möglichkeit, die Analyse von Probenreihen zu automatisieren.

Bei der Gradientenelution werden stärker zurückgehaltene Peptide als viel schärfere, d.h. engere Zonen dargestellt als bei der isokratischen Elution. Insbesondere ist sie unentbehrlich bei der Auftrennung von Peptiden mit hohen Polaritätsunterschieden.

Die Porengröße des Säulentrennmaterials hat einen wesentlichen Einfluß auf die Trennleistung. Die zunächst verwendete Säule Lichrosorb RP 18 ist mit einem Kieselgel gefüllt, dessen Porengröße zwischen 50 und 100 Å liegt und eine Trennung von Peptiden und Proteinen bis zu

einem Molekulargewicht von 20 000 erlaubt. Wie in Abbildung 6 demonstriert, konnten die Peptide 1 - 13 zufriedenstellend getrennt werden. Zwischen den Peptiden 14/15, 16/17 und 18/19 konnte keine ausreichende Auflösung erreicht werden, obwohl die Retentionszeiten dieser Peptide um mehr als 1 Minute differierten. Neu entwickelte Trägermaterialien mit einem größeren Durchlaßvermögen (Porengröße $\geq 300 \text{ \AA}$) besitzen eine bessere Trennfähigkeit und erlauben eine größere Wiederfindung höhermolekularer Proteine (Lewis et al. 1980, Pearson et al. 1981, Mahoney 1982). Die Aquapore RP 300 Säule enthält Kieselgel mit einer Porengröße von $300 \text{ \AA}$. Mit ihr konnte eine zufriedenstellende Trennung der 20 Proopiomelanocorticotropinpeptide erreicht werden (Abbildung 7). Darüberhinaus konnte höhermolekulares Material wie z.B. Prolaktin, hGH, LH und FSH eluiert werden. Weiterhin ergaben sich kürzere Retentionszeiten (120 Minuten anstatt 180 Minuten bei Verwendung von Lichrosorb RP 18), wodurch mehr Analysen pro Tag durchgeführt werden konnten und Elutionsmittel eingespart werden konnte (Richter und Schwandt 1985).

Durch den Einsatz einer Vorsäule, die das gleiche Trennmaterial wie die Aquapore RP 300 enthielt, brauchten zur Analyse keine weiteren Extraktions- oder Reinigungsverfahren durchgeführt werden, da sie höhermolekulare Stoffe aus dem Fettgewebe zurückhielt.

Kritisch war die Präparation von Puffer für die Gradienten-

tenelution, da Verunreinigungen aus dem verwendeten Wasser als störende Peaks während der Analyse auftraten. Zweifach destilliertes Wasser reichte nicht aus, ebenso nicht das zusätzliche Filtrieren des Lösungsmittels durch 0,15 µm - Filter. Es mußte hochreines Wasser mit einem "Millipore Q reagent water system" hergestellt werden, um die Unreinheiten der mobilen Phase zu vermindern. Vor Beginn einer Analyse sollte daher unbedingt ein Gradient ohne Probe gefahren werden, um die Verunreinigungen zu erkennen (Engelhardt 1977).

Der verwendete 0,1 mol/l Natriumphosphatpuffer führte aufgrund seines hohen Salzgehaltes zu einer Herabsetzung der Retentionszeiten. Diese wurden noch weiter durch das Ansäuern des Puffers auf pH 2,1 mit Orthophosphorsäure verkürzt, das auch für eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verantwortlich zu machen ist. Dieser Effekt ist offensichtlich auf eine Verstärkung der Polarität der Peptide zurückzuführen (Hancock et al. 1978). Aus der Zugabe von Säure zum Puffer resultiert darüberhinaus eine Protonierung der Carboxyl- und Aminogruppen der Peptide.

Nachteilig wirkte sich die hohe Salzkonzentration bei Präparationen von Peptidspaltstücken zur weiteren Analyse aus. Trotz Erniedrigung der Molarität des Natriumphosphatpuffers um den Faktor 100 auf 0,001 mol/l mussten vor peptidchemischer Analyse die gesammelten Proben

mit Gelpermeationschromatographie entsalzt werden (Richter und Schwandt 1984).

Die Anzeige der Detektoren in der HPLC ist konzentrations-spezifisch (Halasz 1964). Durch den Schreiber wird die Änderung der Konzentration als Funktion der Zeit registriert. Für die Genauigkeit ist daher eine Konstanz der Flußgeschwindigkeit zu fordern, sie beträgt bei den guten handelsüblichen Geräten $\pm 1\%$. Da im in Frage kommenden Bereich zwischen 1 - 15 μg B-LPH zwischen der Peakfläche und der Menge an B-LPH eine lineare Regression mit einem Korrelationskoeffizient von $r = 0,998$ vorlag, konnte eine quantitative Auswertung erfolgen.

Zusätzliche Auswertungsfehler wurden durch die automatische Probenaufgabe und eine Probenschleife minimiert. Ein innerer Standard (eine bekannte Menge einer im ursprünglichen Gemisch nicht enthaltenen Substanz) wurde nicht verwendet, da keine Substanz gefunden werden konnte, die erstens mit ihrer Retentionszeit die Analyse nicht störte und zweitens während der Inkubation mit keinem der beteiligten Stoffe interferierte.

2. Die Degradation von B-LPH im Fettgewebe des Kaninchens

Bei Inkubation des lipolytisch aktiven Peptidhormons B-LPH mit Fettgewebe des Kaninchens konnte durch die Analyse des wässrigen Unterstandes über die Hochdruck-

flüssigkeitschromatographie eine Degradation dieses Peptids durch die Abnahme des B-LPH-Peaks nachgewiesen werden. Es traten 2 Peptidpeaks (I und II) neu auf. Außerdem wurden weitere aus der Inkubation mit Fettgewebe stammende Substanzen, wie z.B. Adenosin, abgetrennt, deren kurze Retentionszeiten bis 10 Minuten am Anfang des Elutionsgradienten lagen. Ob jedoch gleichzeitig Abbauprodukte von B-LPH in den aus dem Fettgewebe stammenden Peaks eluiert wurden, konnte nicht ausgeschlossen werden. Glyzerin konnte bei der benutzten Wellenlänge von 225 nm nicht detektiert werden. Die freien Fettsäuren Ölsäure, Palmitinsäure, Linolsäure und Linolensäure eluierten bei Retentionszeiten zwischen 130 und 150 Minuten und störten die Analyse nicht.

3. Einfluß von Collagenasepräparationen auf den B-LPH-Abbau

Die Untersuchungen wurden im intakten Fettgewebe oder Homogenat von Fettgewebstücken durchgeführt, um unspezifische Effekte durch Collagenasepräparationen auszuschließen. Diese unspezifische Proteasenaktivität konnte bei den häufig verwendeten Collagenasepräparationen CLS I und CLS II der Fa. Worthington nachgewiesen werden, in geringerer Ausprägung auch noch bei hochgereinigter Collagenase. Collagenase CLS I ist ein Gemisch aus Collagenase, Clostripain, trypsinähnlichen Proteasen und anderen lytischen Enzymen. Collagenase CLS II enthält vorwiegend Clostripain, die trypsinähnliche Aktivität ist etwa wie bei der Collagenase CLS I

ausgeprägt.

Die Inkubation von B-LPH mit Verdünnungen bis zu $1:10^6$ der Konzentration des Collagenasemediums, die üblicherweise zur Fettzellpräparation verwendet wird, führte innerhalb einer Minute zur vollständigen unspezifischen Degradation dieses Peptids. Auch durch wiederholtes Waschen der präparierten Zellen konnten die Proteasen nicht aus der Fettzellsuspension entfernt werden, wie die vollständige Degradation von B-LPH innerhalb einer Minute mit dem dritten Waschpuffer der Adipocyten zeigte. Dagegen degradierte hochgereinigte Collagenase in Verdünnungen niedriger als $1:1000$ B-LPH nicht mehr, der dritte Waschpuffer der Adipocyten führte nur zu einem geringen Abbau. Das Muster dieses Abbaus war ähnlich jenem, das nach Inkubation von B-LPH mit intaktem Fettgewebe festzustellen war. Dies macht wahrscheinlich, daß der hier zu beobachtende Abbau von B-LPH durch aus Fettzellen freigesetzte Proteasen verursacht wurde.

Aus diesem Grund müssen für Untersuchungen von Peptiden und Proteinen an mit Collagenase isolierten Fettzellen folgende Forderungen aufgestellt werden:

Untersuchungen wie die Degradation eines Peptidhormons im Fettgewebe sollten nur mit Adipocyten erfolgen, die mit hochgereinigter Collagenase präpariert wurden, um eine unspezifische Degradation des Peptids weitgehend auszuschließen. Der Gehalt an unspezifischen Proteasen

sollte bei jeder neu verwendeten Collagenase-Charge überprüft werden.

Deshalb wurden die weiteren Untersuchungen mit intaktem Fettgewebe durchgeführt. Ein gewisses Problem bestand in der Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben aufgrund der Oberfläche der Fettgewebsstücke. Darum wurde das Fettgewebe in möglichst kleine gleich große Stücke mit der Schere geschnitten. Parallel wurden immer Untersuchungen mit homogenisiertem Fettgewebe gemacht.

Durch das Homogenisieren des Fettgewebes mit Ultraschall rupturieren die Zellmembranen, das freiwerdende Fett wird emulgiert, Zellorganellen und Proteasen freigesetzt. Bei der gewählten Ultraschalleinwirkungsdauer von 10 Sekunden bei Stufe 5 ist nicht damit zu rechnen, daß Zellorganellen wie Mitochondrien, Mikrosomen, Ribosomen und Lysosomen zerstört werden, da hier Beschallungszeiten von 30 Sekunden bis über 1 Minute notwendig sind (Davidson und Rosett). Es wurden sowohl Beschallungszeiten bis 25 Sekunden und höhere Energie bis Stufe 7 ausprobiert, wobei sich zeigte, daß je länger die Ultraschalleinwirkung und je höher die Energie war, auch die Degradation von B-LPH nach 15 Minuten umso stärker war, hervorgerufen wohl durch eine vermehrte Proteasenfreisetzung aus zerstörten Zellorganellen. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß bei längerer Beschallungszeit und höheren Energien eine beachtliche Erwärmung der Probe durch die Schwingungsenergie auftritt. So steigt die

Temperatur um 10°C bei einer Beschallungszeit von 60 Sekunden und der maximalen Ausgangsleistung von 150 Watt in 50 ml Zellsuspension (Davidson und Rosett). Durch die kurze Beschallungszeit und den intermittierenden Betrieb mit einer Pulsiereinrichtung konnte eine Erwärmung vermieden werden.

4. Verschiedene Einflüsse auf den Abbau von B-LPH im Fettgewebe

Der Abbau von B-LPH im intakten Fettgewebe, im homogenisierten Fettgewebe und in mit hochgereinigter Collagenase präparierten Adipocyten war zeitabhängig, wobei die Degradation bereits nach 30 Sekunden meßbar war. Es zeigte sich kein Unterschied im Abbaumuster zwischen intaktem Fettgewebe, Fettgewebshomogenat und mit hochgereinigter Collagenase präparierten Adipocyten. Während nach 5 Minuten im Fettgewebshomogenat mehr B-LPH als im intakten Fettgewebe degradiert war, zeigte sich nach 30 Minuten kein signifikanter Unterschied.

Das Ausmaß des Abbaus von B-LPH war abhängig von der eingesetzten Fettgewebsmenge. Auch dieser Befund ließ sich an mit hochgereinigter Collagenase präparierten Adipocyten bestätigen, d.h. die Degradation von B-LPH an intaktem Fettgewebe erfolgte durch die Fettzellen.

Der B-LPH-Abbau war pH-abhängig. Die maximale Degrada-

tion an intaktem Fettgewebe lag bei pH 5,0, an homogenisiertem Fettgewebe bei pH 3,0. Im Vergleich dazu lag das Optimum der Insulindegradation durch Fettzellmembranen bei pH 3,8 und durch das Cytosol bei pH 8,0 (Hammond et al. 1975). Sonne und Mitarbeiter (1981) konnten zeigen, daß die Proteolyse von Insulin im pH-Bereich zwischen 6,8 und 8,8 unverändert blieb.

Bei der Untersuchung der Degradation von B-LPH unter verschiedenen physiologischen Bedingungen der Tiere zeigte sich, daß dieses Peptidhormon bei unterschiedlichen Ernährungszuständen und Körpergewichten sowohl an intaktem Fettgewebe wie auch im Fettgewebshomogenat mengenmäßig unterschiedlich abgebaut wurde, ohne daß sich das Peakmuster änderte.

Fettgewebe von ad libitum gefütterten Tieren degradierte signifikant mehr B-LPH als Adipocyten von 72 h nüchtern gesetzten Tieren. Bei zwei Kollektiven gleichaltriger, jedoch unterschiedlich schwerer Kaninchen baute das Fettgewebe der höhergewichtigen Tiere mit größeren Fettzellen signifikant mehr B-LPH ab, als das der niedergewichtigen Tiere mit kleineren Fettzellen. Beobachtungen über Wachstum und bei verschiedenen Ernährungszuständen ergaben, daß die Größe der Fettzellen als Maß ihrer Lipidspeicherung genommen werden kann (Goldrick 1967).

Da die mengenmäßigen Änderungen der Degradation von B-LPH sowohl im intakten Fettgewebe als auch im Fettgewebshomo-

genat auftraten, muß gefolgert werden, daß die Regulation dieser Veränderungen nicht im Bereich eines Rezeptors an der Zellmembran verursacht werden konnten.

Die Zugabe von Insulin in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l hemmte den Abbau von B-LPH im Fettgewebe. Im Fettgewebshomogenat wurde die Proteolyse noch bei einer Konzentration von 10^{-6} mol/l Insulin inhibiert. Deshalb muß angenommen werden, daß die Hemmung durch Insulin im Post-Rezeptorbereich liegt. Eine Hemmung der intracellulären Proteolyse durch Insulin wurde ebenso an isolierten Hepatocyten von Ratten gefunden (Draznin und Trowbridge 1982). Bolinder et al. (1983) führten bei ihren Untersuchungen die unterschiedliche antilipolytische Wirkung von Insulin im omentalen und subcutanen Fettgewebe des Menschen auf Effekte im Post-Rezeptorbereich zurück. Insulin hemmte außerdem die durch Noradrenalin vermittelte Lipolyse, konnte aber den Anstieg von Adenosin-3',5'-phosphat in der Fettzelle nicht verhindern, ein Befund, der auch für eine Regulation im Post-Rezeptorbereich spricht.

5. Die Hemmung der Degradation von B-LPH durch Enzym-inhibitoren

Weitere Untersuchungen waren notwendig, um die an der Degradation beteiligten Proteasen im Fettgewebe zu charakterisieren und den wahrscheinlichen Ort des Abbaus in oder an der Zelle zu lokalisieren. Deshalb

wurden Degradationsversuche von B-LPH nach Inkubation des Fettgewebes mit Proteasenhemmer durchgeführt.

Leupeptin aus Actinomyceten inhibiert die Aktivität der Proteasen Plasmin, Trypsin, Papain und von lysosomalem Cathepsin B (Umezawa 1976). So hemmt Leupeptin die Degradation von intracellulären Peptiden im Muskel (Libby und Goldberg 1978) und des rezeptorgebundenen humanen Choriogonadotropin in den Lysosomen von Leydig Tumorzellen in einer Konzentration von 0,2 mmol/l (Ascoli 1979). In einer Konzentration von 10^{-4} mmol/l hemmte Leupeptin den Abbau von Asialofetuin an Leberzellen der Ratte um 70 % (Tolleshaug und Berg 1981), wobei es neben der proteaseninhibierenden Wirkung auch einen Effekt auf den Transport des Peptids vom Rezeptor zum Lysosom besitzt. Jedoch zeigte Leupeptin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l keinen hemmenden Effekt auf die Degradation von Insulin in Adipocyten der Ratte (Sonne und Gliemann 1983), genauso wenig wie in H4-Hepatom-Zellen (Hofmann et al. 1980). Leupeptin konnte in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l den Abbau von B-LPH im intakten oder homogenisierten Fettgewebe des Kaninchens nicht hemmen, woraus gefolgert werden kann, daß die o.g. Proteasen nicht an der Degradation von B-LPH beteiligt sind.

Antipain, ebenso aus Actinomyceten, hemmt die Wirkung der Proteasen Papain, Trypsin, Thrombokinas, Plasmin und Cathepsin A und B (Umezawa 1976). Antipain war in

Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l ohne Effekt auf die Degradation von B-LPH im Fettgewebe des Kaninchens.

Pepstatin A, ein weiterer aus Actinomyceten isolierter Enzymhemmer, inhibiert die Aktivität von Pepsin, Proctase B, Rennin in vitro und möglicherweise in vivo und besonders stark Cathepsin D (Umezawa 1976). Es beeinflusste ebenso in Konzentrationen von 10^{-6} und 10^{-7} mol/l den Abbau von B-LPH sowohl im Fettgewebshomogenat als auch im intakten Fettgewebe nicht. In einer Konzentration von 7 und 70 μ mol/l war es ohne Wirkung auf die Degradation und Bindung von Insulin an epididymalen Adipocyten der Ratte (Sonne und Gliemann 1983).

Chymostatin aus Actinomyceten inhibiert die Chymotrypsine α , β , γ und δ , Papain und Cathepsin A, B und D (Umezawa 1976). Im Gegensatz zu den bisher genannten Proteaseninhibitoren hemmte es in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l den Abbau von B-LPH im intakten und im homogenisierten Fettgewebe.

Aprotinin mit einer inhibierenden Aktivität auf Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin, Elastase und Cathepsin G (Starkey 1977) hemmte in hohen Konzentrationen von $5 \cdot 10^{-2}$ und $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l den Abbau von B-LPH dosisabhängig in intaktem und homogenisiertem Fettgewebe,

während niedrigere Konzentrationen ineffektiv waren.

Das Antibiotikum Bacitracin aus *Bacillus licheniformis* ist ein Hemmer von Papain, Subtilisin und Leucinaminopeptidase (Mäkinen 1972). Als Hemmer des aus Rattenleberzellen isolierten Enzyms Glutathion-Insulin-Transhydrogenase konnte es in einer Konzentration von 90 $\mu\text{mol/l}$ den extracellulären rezeptorunabhängigen Abbau von Insulin um 50 % inhibieren (Roth 1981). Dagegen fanden Sonne und Gliemann (1983), daß Bacitracin die rezeptorvermittelte Degradation von Insulin an Rattenadipocyten in einer Konzentration von 3 mmol/l nicht hemmte. An der Leberzelle der Maus inhibierte Bacitracin die Proteolyse von Glucagon (Desbuquois et al. 1974), in Rattenadipocyten reduzierte es in einer Konzentration von 30 $\mu\text{mol/l}$ die Proteolyse von Glucagon um 50 % (Gliemann und Sonne 1978). An intaktem und an homogenisiertem Fettgewebe des Kaninchens hatte Bacitracin keinen Effekt auf die Degradation von B-LPH. Heckemeyer et al. (1982) fanden, daß Bacitracin die lipolytische Aktivität von Glucagon und Adrenalin an Adipocyten der Ratte herabsetzen konnte, wobei vermutet wird, daß die antilipolytische Wirkung sich unmittelbar an oder kurz hinter der Zellmembran abspielt. Kahn und Baird (1985) bestätigten die Hemmung der extracellulären Degradation von Insulin an Rattenadipocyten und die fehlende Hemmung des rezeptorvermittelten Abbaus. Allerdings konnte durch eine Temperaturverminderung auf 15°C eine Hemmung der rezeptor-

torvermittelten Degradation von 20 - 40 % durch Bactracin erreicht werden.

Chloroquin ist eine lysosomotrope Substanz (die rasch nach Aufnahme in die Zelle in den Lysosomen angereichert wird), die bekannt ist als ein lysosomaler Hemmer, z.B. bei der Abbauphemmung von exogenen Peptiden in Makrophagen (De Duve et al. 1974). Es inhibiert die Aktivität von Cathepsin B₁, jedoch nicht von Cathepsin D. Chloroquin verminderte die Degradation von Asialofetuin an isolierten Rattenhepatozyten (Tolleshaug et al. 1977). Chloroquin inhibierte in einer Konzentration von 0,1 mmol/l den rezeptorvermittelten Abbau von Insulin an Rattenadipocyten, wobei nicht degradiertes Insulin in den Lysosomen angereichert wird. Dabei wird die Bindung von Insulin bei niedrigen Konzentrationen dieses Hormons an Adipocyten erhöht, während die Bindung an Erythrocyten, die keine Lysosomen besitzen, nicht verstärkt werden konnte (Kobayashi et al. 1980). Auch Hammons und Jarett (1980) und Sonne und Gliemann (1983) fanden an Adipocyten der Ratte eine Hemmung des Insulinabbaus um circa 50 % durch 0,1 mmol/l Chloroquin. Ebenso konnte an humanen, kultivierten Lymphocyten eine Hemmung des Abbaus von hGH durch Chloroquin nachgewiesen werden (Hizuka et al. 1981). Chloroquin hemmte den Abbau von β -LPH im Fettgewebe des Kaninchens in Konzentrationen von 10^{-2} und 10^{-3} mol/l.

NH_4Cl (Ammoniumchlorid) ist ebenso ein bekannter lyso-somaler Enzymhemmer (Carpenter und Cohen 1976). Es blockiert vollständig die rezeptorvermittelte Degradation von EGF in Fibroblasten. In einer Konzentration von 20 mmol/l wurde durch NH_4Cl die Proteolyse von Insulin an H4-Hepatom-Zellen gehemmt, 10 mmol/l reduzierten den Abbau von Asialofetuin in Rattenhepatocyten (Tolleshaug et al. 1977). Sonne und Gliemann (1983) fanden bei 10 mmol/l eine Hemmung der Degradation von Insulin in Rattenadipocyten. In einer Konzentration von 1 und 10 mmol/l hemmte NH_4Cl im intakten Fettgewebe und im Fettgewebshomogenat von Kaninchen den Abbau von B-LPH.

Ca^{2+} ist an vielen intracellulären Prozessen, insbesondere im Zusammenhang mit Transporten durch Membranen, beteiligt. Die Zugabe des Metallchelators EDTA in einer Konzentration von 4 mmol/l, ausreichend um Ca^{2+} und Mg^{2+} vollständig aus dem Inkubationsmedium zu binden, führte an Rattenfettzellen zu einer deutlichen Hemmung der Bindung von Insulin, jedoch nur in geringem Maße zu einer Verminderung der Degradation (Sonne und Gliemann 1983). Auch andere Untersucher fanden bei calciumfreiem Medium eine reduzierte Bindung von Insulin an Rattenfettzellen (Desai et al. 1978, Akhtar und Perry 1979). Die Degradation von B-LPH im Fettgewebe des Kaninchens wurde durch EDTA in Konzentrationen von 10^{-2} und 10^{-3} mol/l inhibiert.

Zusammenfassend kann über die Einflüsse von Proteasenhemmern gesagt werden: Die beiden lysosomotropen Substanzen Chloroquin und NH_4Cl hemmten den Abbau von B-LPH an intaktem Fettgewebe und Fettgewebshomogenat. Eben solche Wirkung zeigte ein Ca^{2+} -freies Medium durch den Metallchelator EDTA.

Die übrigen Peptidasehemmer mit einer inhibierenden Wirkung auf die Enzyme Plasmin, Trypsin, Papain, Cathepsin A, B, D, Proctase B, Pepsin, Rennin, Subtilisin und Leucinaminopeptidase konnten die Degradation von B-LPH im Fettgewebe des Kaninchens nicht hemmen. Chymostatin und Aprotinin, die zusätzlich Chymotrypsin hemmen, Aprotinin außerdem Kallikrein, Elastase und Cathepsin G, konnten den Abbau von B-LPH inhibieren. Somit waren die zuerst genannten Proteasen an der Degradation von B-LPH im Fettgewebe des Kaninchens nicht beteiligt.

6. Hinweise für eine Regulation der Fettgewebsmobilisation durch B-LPH

Da die Hemmung der Degradation von B-LPH im Fettgewebe gleichermaßen an intakten Stücken als auch im Homogenat stattfand, laufen diese Vorgänge am ehesten intracellulär ab. Vergleichsweise zeigten die Untersuchungen von Hammond und Jarett (1975) an subcellulären Fraktionen, daß Insulin zu 90 % im Cytosol degradiert wird, weiterhin in quantitativ bedeutsamer Menge in der

Mikrosomenfraktion und wenig an Plasmamembranen, am geringsten jedoch an Mitochondrien, möglicherweise durch Kontaminationen bei der Präparation verursacht.

Untersuchungen zur Hemmung der lipolytischen Aktivität von B-LPH am Fettgewebe des Kaninchens mit o.g. Proteasenhemmern zeigten, daß die Enzyminhibitoren, die die Degradation von B-LPH hemmen, auch die B-LPH-vermittelte Lipolyse vermindern, während die ohne Effekt auf die Degradation gleichermaßen keine Wirkung bei der Lipolyse zeigten (Richter et al. 1985). Insbesondere haben auch alle lysosomotropen Enzyminhibitoren sowohl die Degradation von B-LPH als ebenfalls die lipolytische Aktivität gehemmt. Daher muß davon ausgegangen werden, daß der lysosomale Abbau von B-LPH Voraussetzung zum Erhalt der lipolytischen Aktivität ist.

Der unterschiedliche Abbau von B-LPH bei unterschiedlichem Körpergewicht und Ernährungszustand, als auch die Hemmung durch Insulin waren verbunden mit unterschiedlicher lipolytischer Aktivität dieses Peptidhormons in diesen Kollektiven (Richter et al. 1985, Jacob et al. 1985). Fettgewebe von ad libitum gefütterten Tieren degradierte signifikant mehr B-LPH als Adipocyten von 72-h-nüchternen Tieren. Diese vermehrte Degradation war von einer höheren Glycerinfreisetzung aus Adipocyten der ad libitum gefütterten Tiere begleitet.

Ähnliche Befunde konnten mit dem Fettgewebe von gleichaltrigen Kaninchen mit unterschiedlichem Körpergewicht erhoben werden. Intaktes Fettgewebe und Fettgewebshomogenat von höhergewichtigen Tieren mit größeren Fettzellen degradierten signifikant mehr β -LPH als niedergewichtige Tiere mit kleinen Fettzellen. Dies war auch von einer stärkeren lipolytischen Aktivität von β -LPH an Adipocyten von höhergewichtigen Tieren begleitet.

Auch die Hemmung der Degradation von β -LPH durch Insulin in Konzentrationen von 10^{-4} und 10^{-5} mol/l in intaktem und homogenisiertem Fettgewebe war mit einer geringeren lipolytischen Aktivität dieses Peptidhormones verbunden.

Die Befunde bei verschiedenen Ernährungszuständen, bei Tieren mit unterschiedlichem Körpergewicht, bei Hemmung der Degradation von β -LPH durch Insulin, Proteasenhemmer wie Chymostatin, Aprotinin und den Metallchelator EDTA und den lysosomotropen Substanzen Chloroquin und NH_4Cl zeigen, daß beim Kaninchen keine lipolytische Aktivität durch β -LPH erhalten werden konnte, wenn nicht gleichzeitig eine intracelluläre Degradation dieses Hormons erfolgte.

Die Analyse der extracellulär vorliegenden neu nach der Inkubation von β -LPH mit Fettgewebe aufgetretenen Peaks I und II ergab, daß sie mit bekannten lipolytisch aktiven oder auch inaktiven Teilsequenzen in Bezug auf

die Retentionszeiten auf der HPLC nicht identisch waren. Insbesondere ergab sich kein Anhalt für die Freisetzung von β -Endorphin, β -MSH oder β -LPH 47 - 53.

Die beiden Peaks, I und II, wurden gesammelt und auf ihre lipolytische Aktivität getestet. Selbst in einer Konzentration von 10^{-6} mol/l kam es nicht zu einer Steigerung der Glyzerinfreisetzung über die Basallipolyse.

Das Molekulargewicht von Peak I und II war fast identisch mit dem von β -LPH, ebenso lagen die typischen Kriterien für die Aminosäurezusammensetzung von β -LPH vor. Die N-terminale Aminosäure von Peak I und II, Glutaminsäure, stimmte mit der von β -LPH überein. Somit kann vermutet werden, daß es sich bei Peak I und II um β -LPH mit einer geringen Deletion oder anderweitiger Modifikation am C-terminalen Ende handelt.

Die lipolytische Wirkung von β -LPH ging teilweise verloren, als die Carboxylgruppe durch Glycinmethylester oder Taurin modifiziert wurde (Gilardeau et al. 1974). Möglicherweise spielt der C-Terminus für die Bindung von β -LPH an den Rezeptor der Fettzelle eine Rolle. Daß die C-terminale Aminosäuresequenz für die Bindung an Rezeptoren entscheidend sein kann, wurde für die Interaktion von β -Endorphin mit Rezeptoren an Lymphocyten (Hazum et al. 1979) und humanem Complement (Schweigerer et al. 1983) gezeigt.

Die extracellulären Abbauprodukte in Peak I und II entsprechen keiner der Teilsequenzen, die bei bisher beschriebenen Proteolysen des B-LPH-Moleküls durch verschiedene Peptidasen und Hypophysenvorderlappen- oder Gehirnexttrakten erhalten wurden.

Tonin, eine Serinprotease der Glandula submandibularis der Ratte, das Angiotensinogen spaltet, zeigte Proteolyse am B-LPH vom Schaf an den Aminosäurepaaren Phe₅₀ - Arg₅₁, Arg₅₁ - Trp₅₂, Arg₆₀ - Tyr₆₁ und Phe₇₈ - Lys₇₉, wodurch B-LPH 61 - 78 entstand, ein Peptid mit Opiatwirkung (Seidah et al. 1979).

Verschiedene Endopeptidasen degradierten in vitro B-LPH 61 - 91, z.B. Rennin an den Aminosäurepaaren 77 - 78, Chymotrypsin und Amillaria mellea - Protease an 78 - 79 und Trypsin an 79 - 80, jedoch nicht an anderen identischen Aminosäurepaaren in der Sequenz 61 - 77 (γ -Endorphin), woraus die Autoren schlossen, daß eine bevorzugte Konformation des Moleküls dieser Sequenz einen Schutz vor dem Angriff von Endopeptidasen bietet (Austen und Smith 1977). Auch Graf und Kenessy (1976) berichteten über eine Spaltung des B-LPH-Moleküls an den Aminosäurepaaren 77 - 78 durch eine Cathepsin B₁ ähnliche Endopeptidase, die sie aus Hypophysenvorderlappenextrakten isolierten.

Graf et al. (1977) fanden eine weitere Endopeptidase in der Pars distalis und der Pars intermedia der Schweine-

hypophyse, die B-LPH an den Aminosäurepaaren Lys₄₆ - Met₄₇, Arg₆₀ - Tyr₆₁, Leu₇₇ - Phe₇₈ und Lys₇₉ - Arg₈₀ spaltet. Bacitracin hemmte diese Degradation ebenso wenig wie Trypsininhibitor aus Sojabohnen, während Trypsininhibitor aus dem Pankreas die Spaltung an den Aminosäurepaaren 60 - 61 und 78 - 79 hemmte.

Mit der Peptidase Cathepsin D, die aus dem Gehirn des Kalbes isoliert wurde, konnte aus B-LPH, bzw. γ -LPH durch Proteolyse B-MSH gewonnen werden (Barat et al. 1979), sodaß angenommen wird, daß diese Protease für die Biosynthese von B-MSH von Bedeutung ist. Trypsin-Sepharose spaltete das B-LPH-Molekül vorwiegend bei Arg₅₁ - Trp₅₂ und Arg₆₀ - Tyr₆₁. Durch die Zugabe von Trifluoräthanol konnte die Proteolyse an Arg₅₁ - Trp₅₂ weitgehend gehemmt werden, und es entstand praktisch nur B-LPH 1 - 60 und B-LPH 61 - 91 = B-Endorphin (Graf und Hollosi 1980). Die Autoren folgerten, daß durch eine Änderung der Konformation des B-LPH-Moleküls eine bevorzugte Spaltung durch trypsinähnliche Proteasen zum Erhalt von B-Endorphin führen. Wie die Degradationsversuche mit Enzyminhibitoren zeigten, war Trypsin an dem Abbau von B-LPH im Fettgewebe des Kaninchens nicht beteiligt.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die erhaltenen B-LPH-Teilsequenzen in Peak I und II aus dem wässrigen Unterstand der Inkubationsversuche, die sich nur gering

durch eine Deletion am C-terminalen Ende von β -LPH unterschieden, Produkte eines unspezifischen Abbaus im Fettgewebe sind. Sie sind gleichermaßen bei der Inkubation von β -LPH mit intaktem Fettgewebe, Fettgewebshomogenat und mit hochgereinigter Collagenase isolierten Adipocyten nachweisbar. Ihr Auftreten ging mengenmäßig nicht mit dem Ausmaß der Degradation von β -LPH einher.

Vielmehr muß bei den an intaktem Fettgewebe und Fettgewebshomogenat erhobenen Befunden unter verschiedenen Bedingungen bei diesem Tiermodell angenommen werden, daß β -LPH in die Fettzelle internalisiert wird und erst nach einem lysosomalen "Processing" die Lipolyse stimulieren kann. Durch eine Veränderung der Aktivität von lysosomalen Enzymen scheint eine Möglichkeit gegeben, die Wirkung von lipolytisch aktiven Peptiden zu steuern. Die dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß der dabei stattfindende lysosomale Abbau von β -LPH in sehr kleine Peptide oder Aminosäuren erfolgt, die sich daher extracellulär nicht mehr spezifisch nachweisen lassen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß β -Lipotropin im Fettgewebe des Kaninchens abgebaut wurde. Diese Degradation war abhängig von der Inkubationszeit, von der eingesetzten Menge Fettgewebe und dem pH-Wert des Inkubationsmediums. Bei ad libitum gefütterten Kaninchen ließ sich im Vergleich zu 72 h nüchtern gesetzten Tieren eine signifikant stärkere Proteolyse dieses Pep-

tidhormons nachweisen, ebenso im Fettgewebe von Tieren mit einem höheren Körpergewicht und größeren Fettzellen. Diese Befunde gingen einher mit einer höheren lipolytischen Aktivität von β -LPH bei ad libitum gefütterten Kaninchen und bei Tieren mit höherem Körpergewicht. Insulin hemmte die Degradation von β -LPH im Fettgewebe.

Die Untersuchungen in Anwesenheit von Proteasenhemmern zeigte, daß Leupeptin, Antipain, Pepstatin A und Bacitracin keinen Einfluß auf die Proteolyse hatten, während Chymostatin, EDTA und die lysosomotropen Substanzen Chloroquin und Ammoniumchlorid den Abbau von β -LPH im Fettgewebe des Kaninchens hemmten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß eine lysosomale Verarbeitung von β -LPH zum Erhalt der lipolytischen Aktivität notwendig ist und die Regulation der lipolytischen Ansprechbarkeit der Adipocyten durch eine Änderung der Enzymaktivität in den Lysosomen erfolgt. Diese Befunde sind ein weiteres Indiz dafür, daß β -Lipotropin für die Regulation der Fettgewebssmasse beim Kaninchen von Bedeutung ist.

E. ZUSAMMENFASSUNG

β -Lipotropin, ein Proopiomelanocorticotropinpeptid aus dem Hypophysenvorderlappen, ist ein starker Stimulator der Lipolyse im Fettgewebe. In der vorliegenden Arbeit konnte am Tiermodell des Kaninchens gezeigt werden, daß β -LPH im Fettgewebe degradiert wird. Dieser Abbau fand in intaktem Fettgewebe, im Fettgewebshomogenat und in mit hochgereinigter Collagenase präparierten Adipocyten in vitro statt und war abhängig von der Inkubationsdauer, der eingesetzten Menge Fettgewebe und dem pH-Wert des Inkubationsmediums.

Die häufig zur Präparation von isolierten Fettzellen verwendeten Collagenasen CLS I und CLS II führten in Verdünnungen bis zu $1:10^6$ der Konzentration des Collagenasemediums innerhalb 1 Minute zur vollständigen unspezifischen Degradation des Peptids. Durch intensives Waschen konnte diese unspezifische Aktivität nicht aus der Fettzellsuspension entfernt werden. Hochgereinigte Collagenase zeigte in Verdünnungen niedriger wie $1:1000$ keine unspezifische degradierende Aktivität mehr, so daß sie durch intensives Waschen aus der Fettzellsuspension entfernt werden konnte. Diese Effekte müssen für biologische Untersuchungen von Peptiden und Proteinen an isolierten Fettzellen berücksichtigt werden.

Der Nachweis und die Quantifizierung der Degradation erfolgte über die Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit

Umkehrphase und Gradientenelution. In dem wässrigen Unterstand der Inkubationsproben traten 2 Peptidspaltstücke neu auf, deren Retentionszeit mit keiner der bekannten POMC-Peptide übereinstimmte. Insbesondere ergab sich kein Anhalt für die Freisetzung von B-Endorphin, B-MSH oder B-LPH 47 - 53. Die beiden Spaltstücke wurden präparativ über die HPLC gesammelt und zur weiteren Charakterisierung das Molekulargewicht mit einer eigens dafür neu entwickelten gelpermeatographischen Methode bestimmt. Die beiden Peptidspaltstücke hatten ein fast identisches Molekulargewicht wie B-LPH, sie hatten die typischen Kriterien für die Aminosäurezusammensetzung wie B-LPH und die N-terminale Aminosäure, Glutaminsäure, stimmte überein. Es muß sich also um B-LPH mit einer geringen Veränderung am C-terminalen Ende handeln. Die beiden Peptidspaltstücke waren nicht lipolytisch aktiv und scheinen ein unspezifisches, extracellulär gefundenes Degradationsprodukt zu sein. Ein Vergleich mit den Ergebnissen in der Literatur zeigt, daß diese Abbauprodukte keiner der Teilsequenzen entsprechen, die bei bisher beschriebenen Proteolysen des B-LPH durch verschiedene Peptidasen und Hypophysenvorderlappen- oder Gehirnextrakten erhalten wurden.

Ein Indiz für die Verknüpfung der lipolytischen Aktivität von B-LPH mit der Degradation im Fettgewebe sind Untersuchungen bei unterschiedlichen Ernährungszuständen und Körpergewichten der Kaninchen. Das Fettgewebe von Kaninchen mit einem höheren Körpergewicht mit durch-

schnittlich größeren Fettzellen bauten mehr β -LPH ab als leichtere gleichaltrige Tiere, ebenso verhielt sich das Fettgewebe von ad libitum gefütterten im Vergleich zu 72 h nüchtern gesetzten Tieren. Insulin hemmte den Abbau von β -LPH. Die vermehrte Proteolyse von β -LPH ging einher mit einer höheren lipolytischen Aktivität, die Hemmung des Abbaus mit einer Inhibition der lipolytischen Aktivität.

Untersuchungen mit Hemmern cellulärer Mechanismen (Proteaseninhibitoren, lysosomotrope Substanzen, Metallchelator) zeigten, daß EDTA, Chymostatin und die lysosomalen Enzyminhibitoren Chloroquin und Ammoniumchlorid die Degradation von β -LPH im intakten Fettgewebe und im Fettgewebshomogenat signifikant verminderten. Diese Hemmung des Abbaus war verknüpft mit einer verminderten Ansprechbarkeit der Adipocyten auf die Stimulation der Lipolyse durch β -LPH. Die Einflüsse von Proteasenhemmern, der Abbau von β -LPH unter verschiedenen Ernährungszuständen und bei unterschiedlichem Körpergewicht als auch die Hemmung durch Insulin geben den Hinweis, daß eine Regulation der lipolytischen Ansprechbarkeit der Adipocyten von Kaninchen durch eine Änderung der lysosomalen Verarbeitung erfolgen könnte.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Akhtar, R.A., Perry, M.C.:
Insulin action in isolated fat cells. II Effects of divalent cations on stimulation by insulin of protein synthesis, on inhibition of lipolysis, and on binding of J-125-labeled insulin to isolated fat cells.
Biochim. Biophys. Acta 585, 117 - 127 (1979)
2. Allen, D.O.:
The role of albumin in hormone stimulated lipolysis.
Biochem. Pharmacol. 28, 733 - 736 (1979)
3. Allen, R.C., Maurer, H.R.:
Electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel.
Walter de Gruyter & Co. Verlag, Berlin. (1974)
4. Anselmino, K.J., Hoffmann, F.:
Das Fettstoffwechselhormon des Hypophysenvorderlappens. I. Nachweis, Darstellung und Eigenschaften des Hormons.
Klin. Wschr. 10, 2380 - 2383 (1931)
5. Aronin, N., Wiesen, M., Liotta, A.S., Schussler, G.C., Krieger, D.T.:
Comparative metabolic clearance rates of B-endorphin and B-lipotropin in humans.
Life Sciences 29, 1265 - 1269 (1981)
6. Ascoli, M.:
Inhibition of the degradation of receptor-bound human choriogonadotropin by leupeptin.
Biochim. Biophys. Acta 586, 608 - 614 (1979)
7. Austen, B.M., Smyth, D.G.:
Specific cleavage of lipotropin C-fragment by endopeptidases: evidence for a preferred conformation.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 77, 86 - 94 (1977)

8. Barat, E., Patthy, A., Graf, L.:
Action of cathepsin D on human B-LPH: a possible
source of human B-MSH.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6120 - 6123 (1979)
9. Barenton, B., Batifol, V., Combarrous, Y., Dolor, J.-P.,
Durand, P., Vezinhet, A.:
Reevaluation of lipolytic activity of growth hormone
in rabbit adipocytes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 122, 197 - 203 (1984)
10. Benuck, M., Grynbaum, A., Cooper, T.B., Marks, N.:
Conversion of lipotropic peptides by purified cathepsin
D of human pituitary: release of γ -endorphin by
cleavage of the Leu₇₇ - Phe₇₈ bond.
Neurosci. Lett. 10, 3 - 9 (1978)
11. Bloom, F., Battenberg, E., Rossier, J., Ling, N.,
Leppaluoto, J., Vargo, T.M., Guillemin, R.:
Endorphins are located in the intermediate and anterior
lobes of the pituitary gland, not in the neurohypo-
physis.
Life Sciences 20, 43 - 48 (1977)
12. Boehnert, M., Schlesinger, D.H.:
Improved manual sequential analysis of peptides.
Anal. Biochem. 96, 469 - 473 (1979)
13. Bolinder, J., Kager, L., Östman, J., Arner, P.:
Differences at the receptor and postreceptor levels
between human omental and subcutaneous adipose tissue
in the action of insulin on lipolysis.
Diabetes 32, 117 - 123 (1983)
14. Bowden, C.R., White, K.D., Lewis, V.J., Tutwiler, G.F.:
Highly purified human growth hormone fails to stimulate
lipolysis in rabbit adipocytes in vitro or in rabbits
in vivo.
Metabolism 34, 237 - 243 (1985)

15. Brewer, J.M., Pesce, A.J., Ashworth, R.B.:
Experimentelle Methoden in der Biochemie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. (1977)
16. Browne, C.A., Bennett, H.P.J., Solomon, S.:
The isolation of peptides by high-performance liquid
chromatography using predicted elution positions.
Anal. Biochem. 124, 201 - 208 (1982)
17. Carpenter, G., Cohen, S.:
125-J-labeled human epidermal growth factor. Binding,
internalization and degradation in human fibroblasts.
J. Cell. Biol. 17, 159 - 171 (1976)
18. Chen, R.F.:
Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal
treatment.
J. Biol. Chem. 242, 173 - 181 (1967)
19. Chretien, M., Davignon, J., Lis, M., Chari, P.U.,
Aubry, F., Gilardeau, C.:
Lipolytic and hypocalcemic effects of sheep B-lipo-
tropic hormone.
Can. J. Physiol. Pharm. 48, 762 - 767 (1970)
20. Chretien, M., Martin, L., Gilardeau, C.:
Les lipotropines hypophysaires.
L'Union Med. Can. 102, 890 - 898 (1973)
21. Chretien, M., Lis, M.:
Lipotropins.
In: Hormonal proteins and peptides. Vol. V. Lipotropin
and related peptides. Ed. Choh Hao Li.
Academic Press, New York, 75 - 102 (1978)
22. Coope, R., Chamberlain, E.N.:
The effect of pituitrin on the fatty acid of the liver.
J. Physiol. 60, 69 - 78 (1925)

23. Cseh, G., Graf, L.:
Species characteristics in lipid mobilizing peptides
of pig pituitary.
In: Protein and polypeptide hormones. Ed. Margoulies.
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, Vol. 2, 498 -
499 (1968)
24. Cseh, G., Graf, L., Goth, E.:
Lipotropic hormone obtained from human pituitary gland.
FEBS Lett. 2, 42 - 44 (1968)
25. Davidson, E.A., Rosett, T.:
Ultrasonic disruption of bacteria and other micro-
-organisms.
Bulletin No. S-835, Branson Sonic Power, Danbury, USA
26. De Duve, C., De Barse, T., Poole, B., Trouet, A.,
Tulkens, P., Van Hoof, F.:
Lysosomotropic agents.
Biochem. Pharm. 23, 2495 - 2531 (1974)
27. Desai, K.S., Zinman, B., Steiner, G., Hollenberg, C.H.:
Effect of calcium on 125-I-insulin binding to rat adi-
pocytes.
Can. J. Biochem. 56, 843 - 848 (1978)
28. Desbuquois, B., Krug, F., Cuatrecasas, P.:
Inhibitors of glucagon inactivation. Effect on glucagon-
-receptor interaction and glucagon-stimulated adenylate
cyclase activity in liver cell membranes.
Biochim. Biophys. Acta 343, 101 - 120 (1974)
29. Draper, M.W., Merrifield, R.B., Rizack, M.A.:
Lipolytic activity of Met-Arg-His-Phe-Arg-Trp-Gly, a
synthetic analogue of the ACTH (4 - 10) core sequence.
J. Medicinal Chem. 16, 1326 - 1330 (1973)

46. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Freychet, P.:
Internalization of polypeptide hormones. Mechanisms,
intracellular localization and significance.
Diabetologia 18, 263 - 274 (1980)
47. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Fan, J.-Y., Orci, L.:
Receptor mediated endocytosis of polypeptide hormones:
mechanisms and significance.
Metabolism 31, 664 - 669 (1982)
48. Graf, L., Cseh, G.:
Isolation of porcine B-lipotropic hormone.
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 3, 175 - 177 (1968)
49. Graf, L., Kenessy, A.:
Specific cleavage of a single peptide bond (residues
77 - 78) in B-lipotropin by a pituitary endopeptidase.
FEBS Lett. 69, 255 - 260 (1976)
50. Graf, L., Kenessy, A., Berzetei, I., Ronai, A.Z.:
Demonstration of B-LPH activating enzyme in porcine
pituitary.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 1114 - 1123 (1977)
51. Graf, L., Cseh, G., Barat, E., Ronai, A.Z., Szekely, J.L.,
Kenessy, A., Bajusz, S.:
Structure-function relationships in lipotropins.
Ann. New York Acad. Sci. 297, 63 - 83 (1977)
52. Graf, L., Hollosi, M.:
Substrate conformation directs selective enzymic
cleavage of B-lipotropin into B-endorphin.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 90, 1089 - 1093 (1980)
53. Hakanson, R., Ekman, R., Sundler, F., Nilsson, R.:
A novel fragment of corticotropin-B-lipotropin precursor.
Nature 283, 789 - 792 (1980)

38. Gilardeau, C., Chretien, M.:
Chemistry and biology of peptides.
Ed. Meinenhofer, J., Ann Arbor Sci. Publ., Michigan.
(1972)
39. Gilardeau, C., Chretien, M., Lis, M.:
Lipotropic and adrenicotropic hormones. Biological
activities of the carboxyl-modified hormones.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 52, 723 - 726 (1974)
40. Gliemann, J.:
Insulin like activity of dilute human serum assayed
by isolated adipose tissue cell method.
Diabetes 14, 643 - 649 (1965)
41. Gliemann, J., Sonne, O.:
Binding and receptor-mediated degradation of insulin
in adipocytes.
J. Biol. Chem. 253, 7857 - 7863 (1978)
42. Goldrick, R.:
Morphological changes in the adipocyte during fat
deposition and mobilization.
Am. J. Physiol. 212, 777 - 782 (1967)
43. Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., Brown, M.S.:
Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated
endocytosis.
Nature 279, 679 - 685 (1979)
44. Goodman, H.M., Grichting, G.:
Growth hormone and lipolysis: a reevaluation.
Endocrinology 113, 1697 - 1702 (1983)
45. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Cohen, S.:
Epidermal growth factor: Morphological demonstration
of binding, internalization, and lysosomal association
in human fibroblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5025 - 5029 (1978)

30. Drazner, B., Trowbridge, M.:
Inhibition of intracellular proteolysis by insulin in
isolated rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. 257, 11 988 - 11 993 (1982)
31. Duckworth, W.C., Heinemann, M.A., Kitabchi, A.E.:
Purification of insulin specific protease by affinity
chromatography.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3698 - 3702 (1972)
32. Engelhardt, H.:
Hochdruckflüssigkeitschromatographie.
Springer Verlag, Berlin, 2. Aufl. (1977)
33. Fitzpatrick T.B., Mosher, D.B.:
Pigmentation of the skin and disorders of melanin
metabolism.
In: Principles of internal medicine. Ed. Harrison, T.R.,
McGraw-Hill Inc., New York. (1983)
34. Freinkel, N.:
Extrathyroidal actions of pituitary thyrotropin: Effects
on the carbohydrate, lipid and respiratory metabolism
of rat adipose tissue.
J. Clin. Invest. 40, 476 - 487 (1961)
35. Frigeri, L.G., Khoo, J.C., Robel, G.:
Absence of lipolytic activity from purified human growth
hormone in cultured 3T3-L1-adipocytes.
Horm. Res. 17, 197 - 201 (1983)
36. Gattereau, A., Chretien, M., Biemann, P.:
Lipogenic activity of a potent lipolytic hormone: Sheep
B-lipotropin.
Horm. Metab. Res 2, 330 - 332 (1970)
37. Gilardeau, C., Chretien, M.:
Isolation and characterization of B-lipolytic hormone
from porcine pituitary gland.
Can. J. Biochem. 48, 1017 - 1021 (1970)

54. Halasz, I.:
Concentration and mass flow rate sensitive detectors
in gas chromatography.
Anal. Chem. 36, 1428 - 1430 (1964)
55. Hammond, J.M., Jarett, L.:
Insulin degradation by isolated fat cells and their
subcellular fractions.
Diabetes 24, 1011 - 1019 (1975)
56. Hammons, G., Jarett, L.:
Lysosomal degradation of receptor-bound 125-I-labeled
insulin by rat adipocytes.
Diabetes 29, 475 - 486 (1980)
57. Hancock, W.S., Bishop, C.A., Prestidges, R.L.,
Harding, D.R.K., Hearn, M.T.W.:
High pressure liquid chromatography of peptides and
proteins. II The use of phosphoric acid in the analysis
of underivatized peptides by reversed-phase high
pressure liquid chromatography.
J. Chromatogr. 153, 391 - 398 (1978)
58. Hazum, E., Chang, K.-J., Cuatrecasas, P.:
Interaction of iodinated human (D-Ala²) β -endorphin
with opiate receptors.
J. Biol. Chem. 254, 1765 - 1767 (1979)
59. Heckemeyer, C., Solomon, S.S., Barker, J., Duckworth, W.C.:
Selective antilipolytic effect of bacitracin in the
isolated fat cell.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 108, 336 - 343 (1982)
60. Hizuka, N., Gorden, P., Lesniak, M.A., Van Obberghen, E.,
Carpentier, J.-L., Orci, L.:
Polypeptide hormone degradation and receptor regulation
are coupled to ligand internalization. A direct bio-
chemical and morphological demonstration.
J. Biol. Chem. 256, 4591 - 4597 (1981)

61. Hofmann, C., Marsh, J.W., Miller, B., Steiner, D.F.:
Cultured hepatome cells as a model system for studying
insulin processing and biological responsiveness.
Diabetes 29, 865 - 874 (1980)
62. Huber, Th., Solomon, S.S., Duckworth, W.C.:
Time-course of insulin degradation in perfused
isolated rat adipose cells.
J. Clin. Invest. 65, 461 - 468 (1980)
63. Jacob, B., Richter, W.O., Schwandt, P.:
Decreased response to B-lipotropin in adipose tissue
from starved rabbits.
4th Eur. Symp. on Metabolism, Padua, 107 (1985)
64. Jean-Baptiste, E., Rizack, M.A.:
In vitro cyclic AMP mediated lipolytic activity of
endorphins, enkephalins and naloxone.
Life Sciences, 27, 135 - 144 (1980)
65. Kahn, C.R., Baird, K.L.:
Pathways of insulin degradation in isolated adipocytes:
evaluation by gel filtration and differential precipitation.
Metabolism 34, 354 - 363 (1985)
66. Karger, B.L., Barth, H., Dallmeier, E., Courtois, G.,
Keller, H.E.:
A study of precision in modern liquid chromatography
using a dedicated computer.
J. Chromatography 83, 289 - 311 (1973)
67. Kitabchi, A.E., Stentz, F.B.:
The effect of inhibitors of insulin processing on generation
of insulin intermediate products from human fibroblasts
as detected by HPLC.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 128, 163 - 170 (1985)

68. Kobayashi, M., Iwasaki, M., Shigeta, Y.:
Receptor mediated insulin degradation decreased by
chloroquine in isolated rat adipocytes.
J. Biochem. 88, 39 - 44 (1980)

69. LaBella, F., Queen, G., Senyshyn, J.:
Lipotropin: localization by radioimmunoassay of en-
dorphin precursor in pituitary and brain.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 75, 350 - 357 (1977)

70. Lee, V., Ramachandran, J., Li, C.H.:
Human pituitary growth hormone. Intrinsic lipolytic
activity on rabbit fat cells.
Arch. Biochem. Biophys. 169, 669 - 677 (1975)

71. Levey, G.S., Robinson, A.G.:
Introduction to the general principles of hormone-
-receptor interactions.
Metabolism 31, 639 - 645 (1982)

72. Lewis, R.V., Fallon, A., Stein, S., Gibson, K.D.,
Udenfriend, S.:
Supports for reverse-phase high performance liquid
chromatography of large proteins.
Anal. Biochem. 104, 153 - 159 (1980)

73. Li, C.H., Barnafi, L., Chretien, M., Chung, D.:
Isolation and amino acid sequence of B-LPH from sheep
pituitary glands.
Nature 208, 1093 - 1094 (1965)

74. Li, C.H., Chung, D.:
Isolation and structure of an untriakonta-peptide with
opiate activity from camel pituitary glands.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1145 - 1148 (1976)

75. Li, C.H., Chung, D.:
Isolation, characterization and amino acid sequence
of B-lipotropin from human pituitary glands.
Int. J. Peptide Protein Res. 17, 131 - 142 (1981)
76. Libby, P., Goldberg, A.:
Leupeptin, a protease inhibitor, decreases protein
degradation in normal and diseased muscles.
Science 199, 534 - 536 (1978)
77. Liotta, A.S., Krieger, D.T.:
In vitro biosynthesis and comparative posttranslational
processing of immunoreactive precursor corticotropin/
B-endorphin by human placental and pituitary cells.
Endocrinology 106, 1504 - 1511 (1980)
78. Lis, M., Gilardeau, C., Chretien, M.:
Fat cell adenylate cyclase activation by sheep B-lipo-
tropic hormone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139, 680 - 683 (1972)
79. Loh, H.H., Tseng, L.F., Wei, E., Li, C.H.:
B-endorphin is a potent analgesic agent.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2895 - 2898 (1976)
80. Lohmar, P., Li, C.H.:
Isolation of bovine B-lipotropic hormone.
Biochim. Biophys. Acta 147, 381 - 383 (1967)
81. Lohmar, P., Li, C.H.:
Biological properties of ovine B-lipotropic hormone.
Endocrinology 82, 898 - 904 (1968)
82. Mäkinen, K.K.:
Inhibition by bacitracin of some hydrolytic enzymes.
Int. J. Peptide Protein Res. 4, 21 - 28 (1972)

83. Mahoney, W.C.:
Isolation of denatured proteins and peptides by high-performance liquid chromatography.
Biochim. Biophys. Acta 704, 284 - 289 (1982)
84. Mains, R.E., Eipper, B.A., Ling, N.:
Common precursor to corticotropins and endorphins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3014 - 3018 (1977)
85. Moore, S.:
Chemistry and biology of peptides. Ed. Meienhofer, J.
Ann Arbor Sciences, Michigan, 629 - 653 (1972)
86. Morris, H.R., Etienne, A.T., Dell, A., Albuquerque, R.:
A rapid and specific method for the high resolution, purification and characterization of neuropeptides.
J. Neurochem. 34, 574 - 582 (1980)
87. Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M.,
Chang, A.C.Y., Cohen, S.N., Numa, S.:
Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor.
Nature 278, 423 - 427 (1979)
88. Narita, K., Matsuo, H., Nakajima, T.:
Protein sequence determination. Ed. Needleman, S.B.
Springer Verlag, Berlin, 30 - 103 (1975)
89. Olefsky, J.M., Marshall, S., Berhanu, P., Saekow, M.,
Heidenreich, K., Green, A.:
Internalization and intracellular processing of insulin and insulin receptors in adipocytes.
Metabolism 31, 670 - 690 (1982)
90. Pearson, J.D., Mahoney, W.C., Hermodson, M.A., Regnier, F.E.:
Reversed-phase supports for the resolution of large denatured protein fragments.
J. Chromatogr. 207, 325 - 332 (1981)

91. Petraglia, F., Fachinetti, F., Parrini, D., Micieli, G.,
De Luca, S., Genazzani, A.R.:
Simultaneous circadian variations of plasma ACTH, B-LPH,
B-endorphin and cortisol.
Horm. Res. 17, 147 - 152 (1983)
92. Posner, B.I., Bergeron, J.J.M., Josefsberg, Z., Khan, M.N.,
Khan, R.J., Patel, B.A., Sikstrom, R.A., Verma, A.K.:
Polypeptide hormones: intracellular receptors and
internalization.
Rec. Prog. Horm. Res. 37, 539 - 581 (1981)
93. Raben, M.S., Landolt, R., Smith, F.A., Hoffmann, K.,
Yajima, H.:
Adipokinetic activity of synthetic peptides related to
corticotropin.
Nature 189, 681 - 682 (1961)
94. Richter, W.O., Wilkening, J., Schwandt, P.:
Stimulation of lipolysis and adenylate cyclase by porcine
B-lipotropin-peptides in isolated rabbit adipocytes.
Acta Endocrinol. Suppl. 225, 70 (1979)
95. Richter, W.O., Schwandt, P.:
Isolation of highly purified B-lipotropin and neurophysins
from a common extract of pituitary glands.
Acta Endocrinol. Suppl. 234, 55 - 56 (1980)
96. Richter, W.O., Schwandt, P.:
Perifusion of human adipocytes with continuous simultaneous
determination of glycerol and free fatty acids.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 812 (1981)
97. Richter, W.O., Jacob, B., Schwandt, P.:
Molecular weight determination of peptides by high per-
formance gel permeation chromatography.
Anal. Biochem. 133, 288 - 291 (1983)

98. Richter, W.O., Schwandt, P.:
In vitro lipolysis of proopiocortin peptides.
Life Sciences 33, Suppl. I, 747 - 750 (1983)
99. Richter, W.O., Kerscher, P., Janetschek, P., Schwandt, P.:
Metabolic effects of β -lipotropin in vivo and in vitro
in the rabbit. In: Central and peripheral endorphins.
Basic and clinical aspects. Ed. Müller, E.E.,
Genazzani, A.R., 197 - 201 (1984)
100. Richter, W.O., Schwandt, P.:
Desalting of peptides by high-performance gel permeation
chromatography.
J. Chromatogr. 288, 212 - 214 (1984)
101. Richter, W.O., Schwandt, P.:
Separation of neuropeptides by HPLC: evaluation of
different supports, with analytical and preparative
applications to human and porcine neurophysins, β -lipo-
tropin, adrenicotrophic hormone and β -endorphin.
J. Neurochem. 44, 1697 - 1703 (1985)
102. Richter, W.O., Jacob, B., Schwandt, P.:
Increased lipolytic responsiveness to β -lipotropin in
fat cells from obese rabbits.
Acta Endocrinol. 108, Suppl. 267, 41 (1985)
103. Richter, W.O., Jacob, B., Schwandt, P.:
Degradation and lipolytic effects of β -lipotropin are
inhibited by lysosomal inhibitors. In: Diabetes,
obesity and hyperlipidemias - III. Ed. Crepaldi et al.,
177 - 184 (1985)
104. Roberts, J.L., Herbert, E.:
Characterization of a common precursor to corticotropin
and β -lipotropin: cell-free synthesis of the precursor and
identification of corticotropin peptides in the molecule.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4826 - 4830 (1977)

105. Rodbell, M.:
Metabolism of isolated fat cells. I Effects of hormones
on glucose metabolism and lipolysis.
J. Biol. Chem. 239, 375 - 378 (1964)
106. Roth, R.A.:
Bacitracin: an inhibitor of the insulin degrading activity
of glutathione-insulintranshydrogenase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 431 - 438 (1981)
107. Rudman, D., Brown, S.J., Malkin, M.F.:
Adipokinetic actions of adrenocorticotropin, thyroid-
-stimulating hormone, vasopressin, alpha- and beta-
-melanocyte-stimulating hormones, fraction H, epinephrine
and norepinephrine in the rabbit, guinea pig, hamster,
rat, pig and dog.
Endocrinology 72, 527 - 543 (1963)
108. Rudman, D., Di Girolamo, M.:
Advances in lipid research. Ed. Paoletti, R., Kritchevsky,
D., Academic Press, New York, Vol. 5, 35 - 117 (1967)
109. Sachs, L.:
Angewandte Statistik.
Springer Verlag, Berlin. 5. Aufl., (1978)
110. Schwandt, P., Richter, W.O., Wilkening, J.:
In vitro lipolytic activity of porcine B-endorphin not
mediated by an opiate receptor.
FEBS Lett. 100, 360 - 362 (1977)
111. Schwandt, P., Richter, W.O.:
Preparation and quantification of B-lipotropin and
related peptides.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 736 - 737 (1980)
112. Schwandt, P.:
Lipolytic effects of ACTH and lipotropins.
Front. Horm. Res. 8, 107 - 121 (1981)

113. Schwandt, P., Richter, W.O.:
Simultaneous separation of brain and pituitary peptides
by high performance liquid chromatography.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 832 (1981)
114. Schwandt, P., Richter, W.O., Morley, J.S.:
 β -lipotropin contains two lipolytic sequences.
Neuropeptides 1, 211 - 216 (1981)
115. Schwandt, P., Richter, W.O., Kriegisch, N.:
Simple automated system for continuous flow determination
of glycerol.
Clin. Chem. 27, 512 - 513 (1981)
116. Schwandt, P., Richter, W.O.:
Analytical and preparative applications of HPLC-separations
of anterior pituitary and hypothalamic peptides.
Acta Endocrinol. Suppl. 253, 97 - 98 (1983)
117. Schweigerer, L., Teschemacher, H., Bhakdi, S.,
Lederle, M.:
Interaction of human β -endorphin with non opiate
binding sites on the terminal SC 5 b-9 complex of
human complement.
J. Biol. Chem. 258, 12 287 - 12 292 (1983)
118. Seidah, N.G., Chan, J.S.D., Mardini, G., Benjannet, S.,
Chretien, M., Boucher, R., Genest, J.:
Specific cleavage of beta-LPH and ACTH by tonin: release
of an opiate-like peptide beta-LPH (61 - 78).
Biochem. Biophys. Res. Comm. 86, 1002 - 1013 (1979)
119. Sonne, O., Gliemann, J., Linde, S.:
Effect of pH on binding kinetics and biological effect
of insulin in rat adipocytes.
J. Biol. Chem. 256, 6250 - 6254 (1981)

120. Sonne, O., Gliemann, J.:
The mechanism of receptor mediated degradation of insulin in isolated rat adipocytes: indirect evidence for a non-lysosomal pathway.
Mol. Cell. Endocrinol. 31, 315 - 331 (1983)
121. Starkey, P.M.:
Proteinases in mammalian cells and tissues.
Ed. Barrett, A.J., North-Holland Publishing Co., Amsterdam. (1977)
122. Steiner, D.F., Terris, S., Chan, S.J., Rubenstein, A.H.:
Chemical and biological aspects of insulin and pro-insulin. In: Insulin.
Ed. Luft, R., Lindgren and Soner Verlag, Moludal, Schweden. (1976)
123. Stevenson, P.M., Fernie, A.:
Thyrotropin - a lipolytic hormone?
Eur. J. Biochem. 35, 318 - 325 (1973)
124. Tamasi, G., Cseh, G., Graf, L.:
Effects of porcine B-lipotrophic hormone on lipid metabolism.
Experientia 25, 360 - 361 (1969)
125. Tanaka, A., Pickering, B.T., Li, C.H.:
Relationship of chemical structure to in vitro lipolytic activity of peptides occurring in adrenocorticotrophic and melanocyte-stimulating hormones.
Arch. Biochem. Biophys. 99, 294 - 298 (1962)
126. Terris, S., Steiner, F.:
Binding and degradation of 125-I-insulin by rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. 250, 8389 - 8398 (1975)

127. Tolleshaug, H., Berg, T., Nilsson, M., Norum, K.R.:
Uptake and degradation of 125-J-labeled asialofetuin
by isolated rat hepatocytes.
Biochim. Biophys. Acta 499, 73 - 84 (1977)
128. Tolleshaug, H., Berg, T.:
The effect of leupeptin on intracellular digestion
of asialofetuin in rat hepatocytes.
Exp. Cell. Res. 134, 207 - 217 (1981)
129. Turpin, B.P., Duckworth, W.C., Solomon, S.S.:
Perifusion of isolated rat adipose cells. Modulation
of lipolysis by adenosine.
J. Clin. Invest. 60, 442 - 448 (1977)
130. Umezawa, H.:
Structures and activities of protease inhibitors of
microbial origin. In: Methods of enzymology, Vol. 45:
Proteolytic enzymes, part B. Ed. Lorand, L.
Academic Press, New York, 678 - 695 (1976)
131. Weisweiler, P., Schwandt, P.:
Untersuchungen zur lipolytischen Aktivität von TSH.
Klin. Wschr. 52, 297 - 299 (1974)
132. White, J.E., Engel, F.L.:
Lipolytic action of corticotropin on rat adipose tissue
in vitro.
J. Clin. Invest. 37, 1556 - 1563 (1958)
133. Woods, K.R., Wang, K.T.:
Separation of dansyl-amino acids by polyamide layer
chromatography.
Biochim. Biophys. Acta 133, 369 - 370 (1967)
134. Yuan, P.M., Pande, H., Clark, B.R., Shively, J.E.:
Microsequence analysis of peptides and proteins. I Pre-
parations of samples by reverse-phase liquid chromatography.
Anal. Biochem. 120, 289 - 301 (1982)

Herrn Prof. Dr. G. Paumgartner, Direktor der II. Medizinischen Klinik, Klinikum Großhadern der Universität München, danke ich für die Unterstützung und Mitberichterstattung.

Herrn Prof. Dr. P. Schwandt danke ich für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Ferner danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. W.O. Richter für die vielseitige geistige Anregung, die praktische Hilfe und die Zusammenarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank seinen jetzigen und früheren Mitarbeiterinnen im Labor: Frau M. Edelmann, Frau W. Hilscher, Frau B. Schalk und Frau E. Schuster.

Lebenslauf

Am 26. April 1956 wurde ich, Gerald Bernd Jacob, als Sohn des Kaufmannes Karl Heinrich Jacob und seiner Ehefrau Elisabeth Ernestine Jacob, geb. Schmiedgen, in Porto, Portugal, geboren. An der Deutschen Schule zu Porto besuchte ich bis 1966 die Grundschule und bis zum Abitur, 1974, den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des dortigen Gymnasiums.

1976 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Die Ärztliche Vorprüfung bestand ich 1978, den 1., den 2. und den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in den Jahren 1979, 1981 und 1982. Am 15.11.1982 erhielt ich die Approbation als Arzt.

Am 1.1.1983 trat ich in die II. Medizinische Klinik (Direktor: Prof. Dr. med. G. Paumgartner), Klinikum Großhadern der Universität München ein. Seither bin ich wissenschaftlich unter Prof. Dr. med. P. Schwandt und PD. Dr. med. W.O. Richter auf dem Gebiet der Stoffwechselkrankheiten tätig.

